

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. September 2005 (15.09.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/085440 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/10

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/002198

(22) Internationales Anmeldedatum:
2. März 2005 (02.03.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2004 010 928.1 5. März 2004 (05.03.2004) DE
10 2005 001 889.0 14. Januar 2005 (14.01.2005) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): SIRS-LAB GMBH [DE/DE]; Winzerlaer Strasse 2a,
07745 Jena (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHMIDT, Karl-Her-
mann [DE/DE]; Waldstrasse 15, 07646 Stadtroda (DE).
STRAUBE, Eberhard [DE/DE]; Hermann-Löns-Strasse
58, 07745 Jena (DE). RUSSWURM, Stefan [DE/DE];
Von-Hase-Weg 32, 07743 Jena (DE). DEIGNER,
Hans-Peter [DE/DE]; M.-Luther-Strasse 23, 68623 Lam-
pertheim (DE). SACHSE, Svea [DE/DE]; Liselotte-Her-
rmann-Strasse 16, 07747 Jena (DE). LEHMANN, Marc
[DE/DE]; Von-Hase-Weg 8, 07743 Jena (DE).

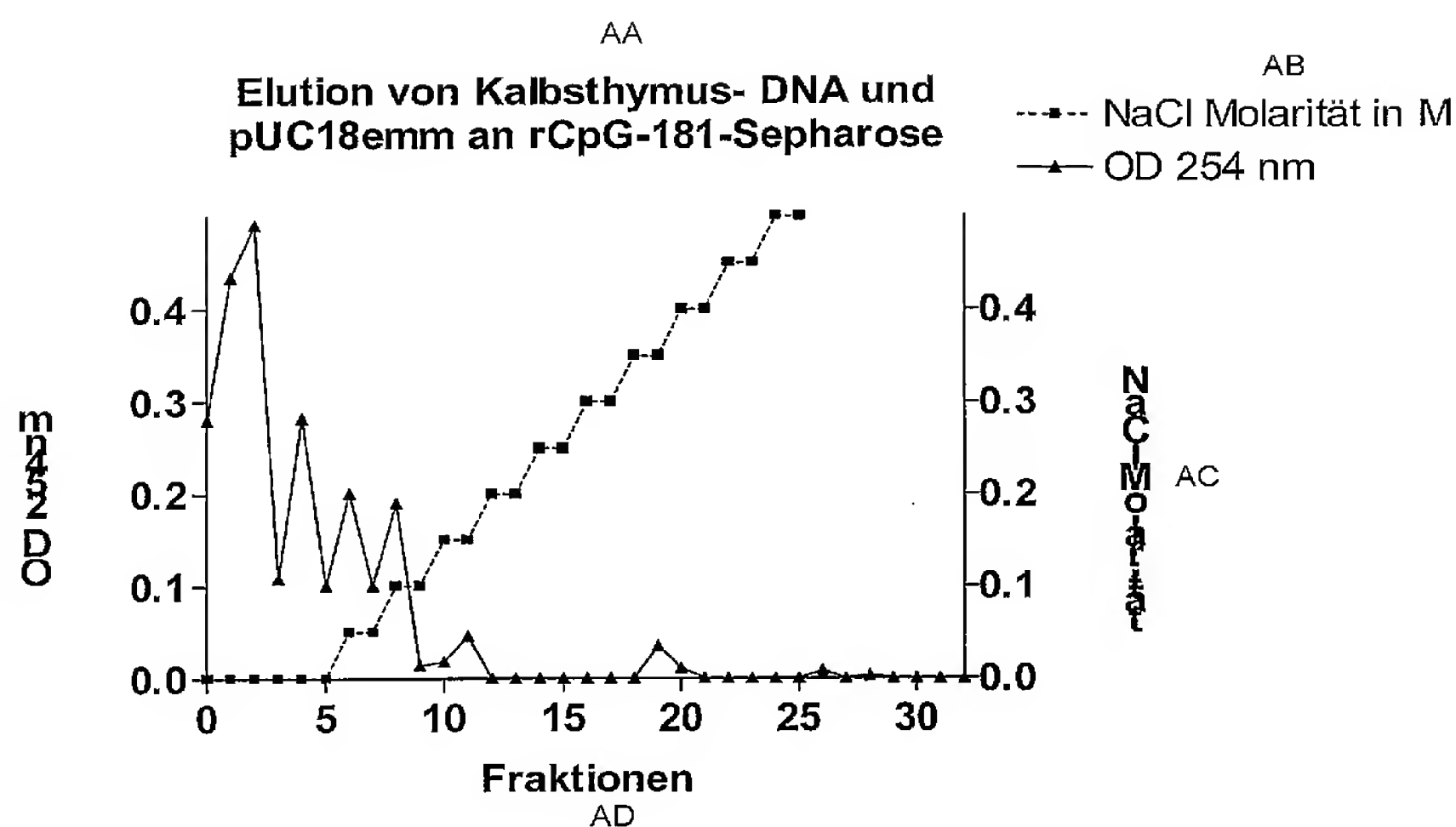
(74) Anwälte: STÖRLE, Christian usw.; Geyer, Fehners &
Partner, Perhamerstrasse 31, 80687 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR ENRICHING AND/OR SEPARATING PROKARYOTIC DNA USING A PROTEIN THAT SPECIFI-
CALLY BONDS TO UNMETHYLATED DNA CONTAINING CPG-MOTIVES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ANREICHERUNG UND/ODER ABTRENNUNG VON PROKARYONTER DNA MIT-
TELS EINES PROTEINS, DAS NICHT-METHYLIERTE CpG-MOTIVE ENTHALTENDE DNA SPEZIFISCH BINDET



AA ELUTION OF CALF THYMUS DNA AND PUC18EMM ON RCPG-181-SEPHAROSE
AB NACL MOLAR CONCENTRATION IN M
AC NACL MOLAR CONCENTRATION
AD FRACTIONS

(57) Abstract: The invention relates to a method for separating and/or enriching prokaryotic DNA, comprising the following steps:
a) contacting of at least one prokaryotic DNA that is in solution with a protein that bonds specifically to prokaryotic DNA, said protein being 25 %-35 % homologous with the wild-type CGPB protein, thus forming a protein-DNA complex; and b) separation of the complex. The invention also relates to a kit for carrying out said method.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2005/085440 A1



KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL,

PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: Es wird ein Verfahren zur Abtrennung und/oder Anreicherung prokaryotischer DNA beschrieben enthaltend die Schritte a. Kontaktieren mindestens einer in Lösung befindlichen prokaryotischen DNA mit einem spezifisch prokaryotische DNA bindenden Protein, dass eine 25%-ige bis 35%-ige Homologie zum Wildtyp-CGPB-Protein aufweist, wodurch ein Protein-DNA-Komplex gebildet wird, und b. Separation des Komplexes. Weiterhin wird ein Kit zur Durchführung des Verfahrens beschrieben.

VERFAHREN ZUR ANREICHERUNG UND/ODER ABTRENNUNG VON PROKARYOTISCHER DNA MITTELS
EINES PROTEINS, DAS NICHT-METHYLIERTE CPG-MOTIVE ENTHALTENDE DNA SPEZIFISCH
BINDET

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Trennung und/oder Anreicherung prokaryonten DNA bzw.
5 zur Abreicherung dieser DNA aus physiologischen Flüssigkeiten unter Verwendung eines
Proteins, das nicht-methylierte Cytidin-Phosphat-Guanosin-Dinukleotide (CpG-Motive) einer
DNA spezifisch bindet, sowie einen Kit zur Durchführung des Verfahrens.

Durch Bakterien verursachte Infektionen sind eine der häufigsten Ursachen für
10 Entzündungskrankheiten. Zur Prognose des Krankheitsverlaufes sowie insbesondere zur
rechtzeitigen Auswahl geeigneter therapeutischer Maßnahmen ist der frühzeitige Nachweis der
bakteriellen Erreger von entscheidender Bedeutung.

Zum Nachweis bakterieller Erreger werden auch heute noch hauptsächlich verschiedene
15 kulturabhängige Methoden angewendet. Aktuelle Studien verdeutlichen jedoch die mangelnde
Eignung von kulturabhängigen Methoden zum Erregernachweis (Hellebrand W., König-Bruhns
C., Hass W., Studie zu Blutkulturdiagnostik im Jahr 2002, Poster Jahrestagung der Deutschen
Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Göttingen 2004; Straube E (2003) Sepsis –
microbiological diagnosis. Infection 31:284). Demnach konnten nur bei ca. 15-16% aller
20 untersuchten Blutkulturen die Erreger ermittelt werden. Die Nachteile dieser Methoden führten
dazu, daß gerade in der letzten Dekade parallel zur stürmischen technologischen Entwicklung
der Molekularbiologie verstärkt nach Alternativen gesucht wurde. Erste Berichte zum Einsatz
kulturunabhängiger Nachweisverfahren bakterieller Erreger, welche auf dem Prinzip der
Polymerasekettenreaktion (PCR) beruhen, stammen vom Anfang der 90er Jahre. So konnten
25 beispielsweise Miller und Kollegen (Miller N J Clin Microbiol. 1994 Feb;32(2):393-7) zeigen,
dass kulturunabhängige Verfahren den klassischen Kultivierungs- und Mikroskopietechniken
beim Nachweis von *Mycobacterium tuberculosis* überlegen sind. In letzter Zeit haben aber
weitere molekularbiologische Methoden, die auf dem Nachweis erregerspezifischer
Nukleinsäuren basieren, an Bedeutung gewonnen (z.B. M. Grijalva et al. Heart 89 (2003) 263-
30 268; Uyttendaele M et al. Lett Appl Microbiol. 2003;37(5):386-91; Saukkoriipi A et al. Mol Diagn.

2003 Mar;7(1):9-15; Tzanakaki G et al. FEMS Immunol Med Microbiol. 2003 Oct 24;39(1):31-6;).

Neben der hohen Spezifität solcher molekularbiologischer Methoden ist der geringe Zeitbedarf als wesentlicher Vorteil gegenüber konventionellen kulturabhängigen Methoden zu nennen. Allerdings ist die Sensitivität des Nachweises prokaryonter DNA direkt aus Körperflüssigkeiten und nicht vorbehandeltem Untersuchungsmaterial im Vergleich zur Kultur der Mikroorganismen bislang viel zu gering. Eine für den direkten Erregernachweis aus nicht vorbehandeltem Untersuchungsmaterial ausreichende Menge an Nukleinsäuren von Bakterien wird auch im Bereich der 16S-rRNA- Analyse, mittels PCR der 16S Region auf dem bakteriellen Chromosom und der anschließenden Sequenzanalyse des PCR Fragmentes, nur eingeschränkt erreicht, da sich meist mehrere Kopien für den die 16S-rRNA kodierenden Abschnitt auf dem Chromosom befinden. Der direkte spezifische Erregernachweis mittels 16S-rRNA Analyse setzt voraus, dass sich nur eine Erreger-Spezies in der zu untersuchenden Probe befindet. Befinden sich verschiedene Erreger-Spezies in der Probe, ist ein spezifischer Nachweis über Sequenzierung der 16S-rRNA Region nicht möglich, da die verwendeten Primer universell für die meisten Bakterien sind. Weiterhin ist für den Erregernachweis mittels 16S-rRNA-Analyse Voraussetzung, dass sich die nachzuweisenden Bakterien in der metabolischen Phase befinden und genügend 16S-rRNA exprimieren. Davon ist insbesondere bei Patienten, die unter einer kalkulierten antibiotischen Therapie stehen, in der Regel nicht auszugehen. Darüber hinaus kommen bestimmte Pathogenitätsfaktoren von Bakterien nicht zu jeder Zeit zur Expression, obwohl die entsprechenden Gene im bakteriellen Genom vorhanden sind. Im Ergebnis werden dem klinisch tätigen Arzt falsch negative Befunde übermittelt. Dadurch kann eine gezielte antibiotische Therapie entweder gar nicht oder viel zu spät eingeleitet werden. Der Arzt ist in solchen Fällen auf sein Erfahrungswissen und allgemeine Richtlinien (wie z.B. der Paul-Ehrlich-Gesellschaft) angewiesen und wird daher viel zu allgemein antibiotisch behandeln. Der nicht zielgenaue Einsatz von Antibiotika birgt eine Reihe von Risiken nicht nur für den einzelnen Patienten (wie z.B. unnötige Nebenwirkungen in Form von Nierenschäden etc.), sondern auch für die gesamte Gesellschaft (z.B. die Entwicklung zusätzlicher Antibiotikaresistenzen wie MRSA (Methicillinresistente *Staphylokokkus aureus*, etc.). Deshalb bietet der Nachweis der klinisch bedeutsamen Pathogenitätsfaktoren und Resistenzen von Bakterien auf chromosomaler und Plasmid-Ebene, also letztendlich auf DNA-Ebene, für die Diagnose vieler Infektionserkrankungen, aber auch der Sepsis, erhebliche Vorteile. Dies gilt um so mehr, da auf dieser Ebene auch eine Unterscheidung zwischen pathogenen und kommensalen Bakterien getroffen werden kann.

Am häufigsten erfolgt der erregerspezifische Nukleinsäurenachweis durch Nukleinsäure-

Amplifikationstechniken (NAT), wie beispielsweise die Vervielfältigung der prokaryonten DNA mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bzw. der Ligase-Kettenreaktion (LCR). Der hohen Spezifität und schnellen Verfügbarkeit der Ergebnisse stehen die Störanfälligkeit durch Kontaminationen oder stark reaktionshemmende Faktoren in klinischen Proben gegenüber.

5

Bei einem herkömmlichen PCR-Nachweisverfahren muß für eine erfolgreiche Detektion von Erregern im Blut theoretisch mindestens 1 Target-DNA des Erregers in 10 µl Blut vorhanden sein. Das entspricht ca. 100 Targets in 1 ml Blut bzw. 1000 Targets in 10 ml Blut. Anders verhält es sich bei der Blutkultur zum Nachweis von Erregern einer Infektion. Hier liegt die untere Nachweisgrenze bei etwa 3-5 Bakterien pro 10 ml Blut.

10

Diese Nachweisgrenze wird derzeit mit PCR-Verfahren noch nicht erreicht, auch nicht mit solchen, die ihre Zielsequenz im Bereich der 16S-rRNA Region auf dem Chromosom haben. Obwohl mehrere die 16S rRNA kodierende Regionen auf dem bakteriellen Chromosom lokalisiert sind, meist 3 bis 6, bleibt die Voraussetzung, daß sich mindestens ein Molekül der Template-DNA im PCR-Reaktionsgemisch befindet, unerfüllt.

15

Eine verbesserte diagnostische Sicherheit ist von PCR-Verfahren zu erwarten, deren spezifische Zielsequenzen für speziesspezifische Proteine kodieren, entweder im Chromosom oder auf Plasmiden der Mikroorganismen. Auch hier trifft das Obengesagte zur Nachweisgrenze zu. Gerade unter dem Einfluß einer laufenden Antibiotikatherapie kann das Wachstum der Erreger stark verlangsamt, eingeschränkt oder blockiert sein, auch wenn das eingesetzte Antibiotikum letztlich nicht optimal wirksam ist. Diese Situation ist gerade bei solchen Patienten häufig anzutreffen, die bereits unter Antibiotikatherapie stehen und bei denen aus diesem Grund keine krankheitsverursachenden Bakterien aus den Blutkulturen oder anderen Proben (wie z.B. Trachealabstrichen, bronchoalveolären Lavagen (BAL) etc.) angezüchtet werden können.

20

25

Wegen unzureichender Sensitivität hat der erregerspezifische Nukleinsäurenachweis ohne Amplifikationsschritt durch direkten Nachweis der prokaryonten DNA (Sondentechnik, FISH-Technik) nur bei ausreichend hoher Keimzahl im Untersuchungsmaterial diagnostische Bedeutung.

30

Die wesentliche Problematik des Nachweises prokaryonter DNA zur Identifikation bakterieller Erreger in Körperflüssigkeiten bestehen neben PCR-hemmenden Bestandteilen im Untersuchungsmaterial vor allem in der geringen Konzentration prokaryonter DNA und den damit einhergehenden Überschuß eukaryonter gegenüber prokaryonter DNA. Hierbei sind insbesondere kompetitive Prozesse bei der DNA-Analyse sowie die geringe Menge an

35

prokaryonter DNA als hinderlich für einen qualitativen und quantitativen Erregernachweis anzusehen.

Die üblichen Methoden zur DNA-Isolierung reichern die Gesamt-DNA einer Körperflüssigkeit an, so daß das Verhältnis Wirts-DNA zu mikrobieller DNA zwischen $1:10^{-6}$ und $1:10^{-8}$ betragen kann. Aus diesem Unterschied ist die Schwierigkeit des Nachweises mikrobieller DNA in Körperflüssigkeiten gut nachzuvollziehen.

Prokaryonte DNA unterscheidet sich von eukaryonter DNA beispielsweise durch das Vorkommen nicht-methylierter CpG-Motive (Hartmann G et al., Deutsches Ärzteblatt, Jg. 98/15:A981-A985 (2001)). In der prokaryonten DNA befinden sich CpG-Motive in einem 16-fachen Überschuß im Vergleich zu eukaryonter DNA, die solche Motive nur übergangsweise enthält, z.B. in Krebszellen oder Promotorregionen. In prokaryonter DNA sind diese Motive nicht methyliert, wohingegen sie in eukaryonter DNA zum größten Teil methyliert sind, was die Unterschiedlichkeit nochmals erhöht. Nicht-methylierte CpG-Motive sind nicht-methylierte Deoxycytidylat-Deoxyguanylat-Dinucleotide innerhalb des prokaryonten Genoms oder innerhalb von Fragmenten desselben.

Es ist weiterhin bekannt, dass aus unterschiedlichen Methylierungsmustern innerhalb der humanen DNA diagnostische Aussagen für Krebserkrankungen ableiten lassen (Epigenetics in Cancer Prevention: Early Detection and Risk Assessment (Annals of the New York Academy of Sciences, Vol 983) Editor: Mukesh Verma ISBN 1-57331-431-5). Anhand von methylierten und nicht-methylierten Cytosinen im Genom lassen sich gewebe-, aber auch krankheitsspezifische Muster identifizieren. Die spezifischen Methylierungsmuster für eine Krankheit ermöglichen zum einen eine Diagnose zu einem sehr frühen Zeitpunkt, zum anderen auch molekulare Klassifikation einer Krankheit und die wahrscheinliche Reaktion eines Patienten auf eine bestimmte Behandlung. Ausführliche Informationen hierzu können beispielsweise aus Beck S, Olek A, Walter J.: From genomics to epigenomics: a loftier view of life., Nature Biotechnology 1999 Dec;17(12):1144, der Homepage der Epigenomics AG (<http://www.epigenomics.de>) oder aus WO 200467775 entnommen werden.

In Cross et al. wurde gezeigt, dass es möglich ist, unterschiedlich methylierte genomische humane DNA zu trennen, indem die methylierte CpG-Motive an ein Protein gebunden werden (Cross SH, Charlton JA, Nan X, Bird AP, Purification of CpG islands using a methylated DNA binding column, Nat Genet. 1994 Mar;6(3):236-44). Dieses Verfahren dient also zur Bindung methylierte CpG-Motive enthaltende DNA. Eine ausreichende Trennung von nicht-methylierter und methylierter DNA ist aus technischen Gründen nicht möglich, da dass verwendete Protein auch nicht-methylierte DNA schwach bindet. Auch eine Anreicherung von nicht-methylierter

DNA ist mit diesem Verfahren nicht möglich, da die Kapazität des verwendeten Proteins nicht ausreicht, um bei einem hohen Überschuss an methylierter DNA in ausreichendem Maße von nicht-methylierter DNA zu trennen. Weiterhin bleibt durch die Bindung der methylierten DNA das Ausgangsvolumen in welchem sich die nicht-methylierte DNA befindet unverändert, so
5 dass keine Anreicherung erreicht wird.

Es wäre also wünschenswert, die nicht-methylierte DNA von methylierter DNA zu trennen und nicht-methylierte DNA anreichern zu können, um somit prokaryonte von eukaryonter DNA bzw. unterschiedlich methylierte humane DNA voneinander zu trennen. Es wäre zudem
10 wünschenswert und von hohen gesundheitsökonomischen Interesse, dass die Trennung und Anreicherung von nicht-methylierter DNA auch aus einem Gemisch (beispielsweise Vollblut) erreicht werden könnte, dass durch einen hohen Überschuss an methylierter DNA charakterisiert ist.

15 Aus Voo et al. ist bekannt, dass das humane CpG-bindende Protein (hCGBP) in der Lage ist, nichtmethylierte CpG-Motive zu binden. Die Publikation beschreibt den transkriptionsaktivierenden Faktor hCGBP, von dem gezeigt wurde, dass er eine Rolle in der Regulation der Expression von Genen innerhalb von CpG-Motiven spielt.

20 In EP 02020904 wurde ein Verfahren gezeigt, das die Trennung und Anreicherung von prokaryonter DNA aus einem Gemisch aus prokaryonter und eukaryonter DNA durch Bindung der prokaryonten DNA an ein spezifisch nicht-methylierte DNA bindendes Protein ermöglicht.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren bereitzustellen, die
25 die Trennung und/oder Anreicherung prokaryonter DNA aus Untersuchungsproben mit hohem Anteil eukaryonter DNA, insbesondere von Patienten mit Infektionen, ermöglicht.

Erfindungsgemäß wird dies durch ein Protein erreicht, das nicht methylierte CpG-Motive bindet, wobei es eine 25%ige bis 35%ige Homologie, insbesondere etwa 27,6 %ige Homologie, zum
30 Wildtyp-CPGB-Protein aufweist und gegenüber diesem maximal bis zur Länge der Bindungsstelle verkürzt ist.

Als Wildtyp-CPGB-Protein (oder CPGbP656) wird im folgenden das humane CPGB-Protein (vgl. Voo et al., Mol Cell Biol. 2000 Mar; 20(6): 2108-21.) bezeichnet. Das erfindungsgemäße
35 Protein wird im folgenden als CPGbP181 bezeichnet. Das in EP 02020904 beschriebene Protein, das eine verkürzte Variante des Wildtyp-CPGB-Proteins ist und als Grundlage für das erfindungsgemäße Protein diente, wird im folgenden mit CPGbP241 bezeichnet.

Die Erfindung wird nachfolgend unter Bezugnahme auf die Figuren beschrieben, wobei

Figur 1 die Aminosäuresequenz von CPGbP181 (fett dargestellt) verglichen mit dem Wildtyp-CPGB-Protein (CPGbP656) und dem CPGbP241 (kursiv dargestellt) zeigt;

Figur 2 die DNA Sequenz und Übersetzung in die Aminosäuresequenz des kompletten CPG-bindenden Proteins CPGbP656 zeigt, wobei die verkürzten CPG-bindenden Peptide CPGbP241 (fett) und CPGbP181 (kursiv) dargestellt sind;

10

Figur 3 eine PCR von Streptokokken-DNA in Humanblut darstellt;

Figur 4 eine nested PCR mit den PCR-Produkten aus dem Primär-PCR-Ansatz von Figur 3 als Template zeigt;

15

Figur 5 ein Gelretardierungsexperiment darstellt

Figur 6 ein weiteres Gelretardierungsexperiment wiedergibt;

Figur 7 die Elution von Kalbsthymus-DNA und pUC18emm an rCpG-181-Sepharose zeigt, und

Figur 8 die Darstellung der Bestimmung der eluierten DNA in den Fraktionen durch Messung der Extinktion bei 254 nm in Abhängigkeit des NaCl-Gradienten ist.

25

Figur 9 Ergebnisse der PCR nach Anreicherung prokaryontischer DNA aus DNAGemisch von *Staphylococcus aureus* und human DNA unter Verwendung von gekoppeltem CpGbP-181-Protein an CNBr- Sepharose

30

und

Figur 10 Ergebnisse der PCR nach Anreicherung prokaryontischer DNA aus einem DNA-Gemisch von *Staphylococcus aureus* und humaner DNA unter Verwendung von gekoppeltem CpGbP-181-Protein an AH-Sepharose darstellen.

35

Das Wildtyp-CPGB-Protein CPGbP656 bindet nicht methylierte CpG-Motive prokaryonter DNA, wobei ein Protein-DNA-Komplex gebildet wird. Dieser kann z.B. auf einem Träger gebunden sein oder werden, wodurch eine Trennung und/oder Anreicherung der DNA erfolgen kann. Die

vorliegende Erfindung basiert nun auf der überraschenden Erkenntnis, das ein im Vergleich zum Wildtyp-CPGB-Protein (CPGbP656 mit 656 Aminosäuren) verkürztes Protein, das eine 25%ige bis 35%ige, insbesondere etwa 27,6%ige, Homologie zum Wildtyp-CPGB-Protein aufweist, eine verbesserte Bindungseigenschaft gegenüber nicht methylierten CpG-Motiven prokaryonter DNA als das Wildtyp-CPGB-Protein und Varianten davon mit 80% oder mehr Homologie besitzt. Beispiel eines solchen verkürzten Proteins ist CPGbP181 mit 181 Aminosäuren.

Prokaryonte DNA unterscheidet sich von eukaryonter DNA beispielsweise durch das Vorkommen nicht methylierter CpG-Motive (Deutsches Ärzteblatt, Jg. 98/15: A981-A985 (2001)). Die Erfindung basiert auf der Kenntnis, daß sich eukaryonte DNA und prokaryonte DNA durch ihren Anteil an CpG-Motiven unterscheiden. In der prokaryonten DNA befinden sich CpG-Motive in einem 20-fachen Überschuß im Vergleich zu eukaryonter DNA, die solche Motive nur übergangsweise enthält, z.B. in Krebszellen oder Promotorregionen ((Deutsches Ärzteblatt, Jg. 98/15: A981-A985 (2001)). In prokaryonter DNA sind diese Motive nicht methyliert, wohingegen sie in eukaryonter DNA zum größten Teil methyliert sind, was die Unterschiedlichkeit nochmals erhöht. Nicht methylierte CpG-Motive sind nicht methylierte Deoxycytidylat-Deoxyguanylat-Dinucleotide innerhalb des prokaryonten Genoms oder innerhalb von Fragmenten desselben.

Des weiteren basiert die Erfindung auf der Kenntnis, daß das erfindungsgemäße Protein spezifisch an nicht methylierte CpG-Motive bindet. Diese spezifische Bindungseigenschaft des erfindungsgemäßen Proteins wird genutzt, um prokaryonte DNA zu binden und dadurch nachfolgend aus einer Probe z.B. mit überwiegendem Anteil eukaryonter DNA anzureichern, zu trennen und zu isolieren.

Die Bezeichnung „nicht-methylierte CpG-Motive enthaltende DNA“ bezieht sich dabei sowohl auf eukaryonte als auch prokaryonte DNA. Diese kann aufgereinigt und wieder in Lösung gebracht sein (z.B. aus Geweben isolierte nicht-methylierte DNA) oder direkt in der Ursprungsquelle (z. B. Körperflüssigkeit, wie Blut, Serum, Trachealaspirat, Urin, bronchalveoläre Lavage, Nasenabstrich, Hautabstrich, Punktionsflüssigkeit) vorliegen.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist die nicht-methylierte CpG-Motive enthaltende DNA prokaryonte DNA, insbesondere bakterielle DNA.

Der Begriff „Homologie“ im Sinne der vorliegenden Erfindung bezeichnet den Grad der Übereinstimmung von zwei Protein-Sequenzen. Dabei bedeutet z. B. 60%ige Homologie, daß 60 von 100 Aminosäure-Positionen in den Sequenzen übereinstimmen. Der Ausdruck „verkürzt“

wie er zur Charakterisierung des erfindungsgemäßen Proteins verwendet wird, bedeutet, daß die Länge der Aminosäuresequenz des erfindungsgemäßen Proteins (z. B. CPGBP181) kürzer als die Länge der Aminosäuresequenz des Wildtyp-CPGB-Proteins (CPGBP656) ist. Die Verkürzung erfolgt am N-terminalen und am C-terminalen Ende der Wildtyp-Proteinsequenz (Figur 1). Die maximale Verkürzung stellt dabei die DNA-Bindestelle des Proteins dar.

Das erfindungsgemäß eingesetzte Protein kann z. B. ein Molekulargewicht von etwa 19959 Dalton (nativ) bzw. 21444 Dalton (im Plasmid pQE60) aufweisen. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform beträgt der isoelektrische Punkt des erfindungsgemäßen Proteins etwa 10,09 (natives Protein) bzw. 10,15 (im Plasmid pQE60). Ein besonders bevorzugtes erfindungsgemäß eingesetztes Protein besitzt die in SEQ ID No. 2 bzw. Fig. 1 dargestellte Aminosäuresequenz. Dieses hat besonders gute Bindungseigenschaften gegenüber nicht methylierten CpG-Motiven prokaryonter DNA.

Das in EP 02020904 beschriebene Protein (CPGBP241), das eine verkürzte Variante des Wildtyp-CPGB-Proteins (CPGBP656) ist und als Grundlage für das erfindungsgemäß eingesetzte Protein (z. B. CPGBP181) diente, hat eine Länge von 241 Aminosäuren, ein Molekulargewicht von etwa 33650 Dalton (nativ) bzw. 28138 Dalton (im Plasmid pQE60) und einen isoelektrischen Punkt von 9,89 (nativ) bzw. 9,88 (im Plasmid pQE60). Die cDNA- und Aminosäuresequenz ist in Fig. 1 und 2 gezeigt.

Das Wildtyp-CGBP-Protein hat eine Länge von 656 Aminosäuren, 135 positiv und 94 negativ geladene Reste, ein Molekulargewicht von etwa 75684 Dalton und einen isoelektrischen Punkt von 8,15. Die cDNA- und Aminosäuresequenz ist in Fig.1 gezeigt.

Der Sequenzvergleich des erfindungsgemäß eingesetzten Proteins CPGBP181 gemäß SEQ ID No. 2 mit dem in EP 02020904 beschriebenen Protein (CPGBP241) ist in Fig. 1 und 2 dargestellt.

Das erfindungsgemäß eingesetzte Protein wird bevorzugt durch Klonierung der entsprechenden cDNA-Sequenz in ein Plasmid und Expression in *Escherichia coli* hergestellt. Ein das erfindungsgemäße Protein exprimierender *E.coli*-Stamm wurde am 16. Februar 2004 unter der Nr. DSM 16229 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen hinterlegt. Alternativ können andere, dem Fachmann vertraute Verfahren zur Herstellung angewendet werden. Die Nutzung des Plasmids pQE9 stellt dabei eine beispielhafte Möglichkeit dar, aber jedes andere geeignete Plasmid ist als Vektor einsetzbar. Die Expression in *E. coli* stellt ebenfalls nur ein Beispiel dar. Eine Expression in anderen prokaryonten System als auch in einem eukaryonten System als auch die chemische oder enzymatische Synthese oder die

Aufreinigung aus einer natürlichen Quelle, wie z.B. Tabakpflanzen, sind weitere mögliche Ausführungsformen der Proteingewinnung. Das Protein kann sowohl im Labormaßstab (z.B. im Erlenmeyerkolben) als auch im industriellen Maßstab (z.B. Fermenter) hergestellt werden. Das erfindungsgemäße Protein kann z.B. mittels Bindung von an den Anfang oder das Ende des Proteins eingebrachten Histidin-Reste (His-tag) an eine geeignete nickelhaltige Matrix gereinigt werden, eine Methode, die dem Fachmann bekannt ist.

Weitere Möglichkeiten der Reinigung können jegliche Art von Fusionsproteinen sein, die eine Aufreinigung über geeignete Matrices (Säulen, Gele, Beads etc.) erlauben. Andere Formen von tag's können Fusionspeptide / -proteine, z.B. Streptavidin-tag, Myc-tag und andere sein.

Eine bevorzugte Form des erfindungsgemäß eingesetzten Proteins ist die native Form, aber auch eine denaturierte Form ist zur Bindung nicht methylierter CpG-Motive geeignet. Unter „denaturierten Formen“ im Sinne der vorliegenden Erfindung werden andere Sekundärstrukturen als die in der Natur vorkommenden verstanden.

Die native oder auch denaturierte Form des erfindungsgemäß eingesetzten Proteins stellt eine beispielhafte Ausführungsform dar. Die Erfindung schließt die *in vitro*-Synthese sowie alle weiteren chemischen oder enzymatischen Modifikation des Proteins ein, wie z.B. Einbau von Disulfidbrücken, Glykosylierungen, Phosphorylierungen, Acylierungen, Aminosäureaustausche sowie Fusion mit Proteinen oder anderen Molekülen ein. Solche Modifikationen können z.B. durch Rekombination und/oder Expression und/oder chemische und/oder enzymatische Modifikation einzelner oder mehrerer Aminosäuren erzielt werden.

Das erfindungsgemäß eingesetzte Protein weist eine Vielzahl von Vorteilen auf. Es kann, besser als das Wildtyp-CPGB-Protein oder Varianten davon mit 80% oder mehr Homologie, prokaryonte DNA über nicht methylierte CpG-Motive binden. Dadurch wird es möglich, aus einem Gemisch von prokaryonter und eukaryonter DNA die prokaryonte DNA spezifisch abzutrennen und/oder anzureichern. Dies ermöglicht letztendlich einen schnellen und einfachen Erregernachweis sowie eine frühzeitige Diagnose von Infektionen, die durch bakterielle Erreger verursacht sein können. Vice versa kann die Erfindung auch zur Abreicherung mikrobieller DNA im Sinne einer Reinigung bei klinischen Zuständen angewandt werden, die mit einem unphysiologischen Vorkommen von Bakterien oder deren Spaltprodukten Körperflüssigkeiten, insbesondere Blut, von Patienten einhergehen. Dies gilt umso mehr, da gut belegt ist, daß Bakterien aber auch deren Spaltprodukte, wie beispielsweise bakterielle DNA, für eine Vielzahl den Patienten schädigenden biologischen Effekte verantwortlich sind.

Aufgrund der guten Bindungsfähigkeit des erfindungsgemäß eingesetzten Proteins an nicht methylierte CpG-Motive prokaryonter DNA ist Gegenstand der Erfindung ein Verfahren zur Trennung und/oder Anreicherung prokaryonter DNA mit den Schritten

- 5 a) Kontaktieren mindestens einer in Lösung befindlichen prokaryonter DNA mit einem spezifisch prokaryonte DNA bindenden Protein, dass eine 25%ige bis 35%ige Homologie zum Wildtyp-CGPB-Protein aufweist, wodurch ein Protein-DNA-Komplex gebildet wird, und
- b) Separation des Komplexes.

10

Die DNA kann aufgereinigt und wieder in Lösung gebracht sein oder direkt in der Ursprungsquelle (z. B. Körperflüssigkeit, wie Blut, Serum, Trachealaspirat, Urin, bronchaleveoläre Lavage, Nasenabstrich, Hautabstrich, Punktionsflüssigkeit) vorliegen.

- 15 Die Separation kann mittels verschiedener Verfahren zur Trennung, Isolierung oder Anreicherung von DNA-Protein-Komplexen oder DNA-Polypeptid-Komplexe erfolgen, die dem Fachmann hinlänglich bekannt sind. Dabei werden bevorzugt Methoden angewendet, bei denen das DNA-bindende Protein an einen Träger immobilisiert ist oder wird, um die DNA aus der Probelösung zu trennen und/oder anzureichern.

20

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform schließt sich an die Separation ein Schritt zur Abtrennung der DNA vom erfindungsgemäßen Protein aus dem Komplex an. Dies kann beispielsweise durch herkömmliche Verfahren zur DNA-Aufreinigung erfolgen, die dem Fachmann bekannt sind. Im einfachsten Falle beruht die Abtrennung auf der Änderung des pH-

25 Wertes oder der Salzkonzentration (z. B. auf 1 M NaCl) des Mediums/Puffers oder der Zufügung chaotroper Reagenzien, etc; also geeignete Parameter, die zur Auflösung des Protein-DNA-Komplexes führen. Solche Methoden sind dem Fachmann bekannt.

30

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das erfindungsgemäße Protein an einen Träger gebunden. Diese Ausführungsform stellt eine besonders einfache Möglichkeit der Anreicherung prokaryonter DNA dar, da die Separation aus der Lösung besonders einfach, beispielsweise durch physikalischer Entfernung (z.B. Abzentrifugation) des oder der beladenen Träger aus der Lösung, erfolgen kann.

35

Für die Lösung für die prokaryonte DNA kommt grundsätzlich jedes geeignete Lösungsmittel in Frage. Besonders zweckmäßig ist das Verfahren jedoch zur Anreicherung prokaryonter DNA aus Lösungen, die verschiedene biomolekulare Spezies, insbesondere verschieden Arten von DNA, enthalten. Die Erfindung betrifft vorzugsweise ein Verfahren zur Trennung und

Anreicherung prokaryonter oder viraler DNA aus einem Gemisch von prokaryonter und eukaryonter DNA. Dabei wird beispielsweise die in Körperflüssigkeiten befindliche prokaryonte DNA durch spezifische Bindung an das erfindungsgemäße Protein von der eukaryonten DNA getrennt und angereichert. Die so angereicherte prokaryonte DNA erleichtert den Nachweis
5 prokaryonter Erreger mit Hilfe molekularbiologischer Methoden und kann zur Diagnose von Krankheiten, die durch pathogene Erreger verursacht werden, beitragen.

Insbesondere die Ausführungsform, bei der das erfindungsgemäße DNA-bindende Protein an die Oberfläche eines Trägers immobilisiert ist, eignet sich für eine Adsorption prokaryonter DNA
10 aus Körperflüssigkeiten, vorzugsweise aus dem Blut. Dieser Ansatz bietet überdies die Möglichkeit, mikrobielle DNA, die im Blut oder anderen Körperflüssigkeiten vorliegt, aus diesen zu entfernen. Die so von der mikrobiellen DNA, die auch allein in der Lage ist, schwere Entzündungsreaktionen bei Patienten auszulösen, gereinigte Körperflüssigkeit (z. B. Vollblut, Serum oder Liquor), kann dann in den Körper zurückgeführt werden. Dieses Prinzip kann also
15 zur Abreicherung prokaryonter DNA aus physiologischen Flüssigkeiten im Sinne der Reinigung eingesetzt werden, wobei die speziellen Bindungseigenschaften des erfindungsgemäßen Proteins genutzt werden.

Zur Steigerung der Bindungskapazität und -effizienz für die nicht-methylierten CpG-Motive einer
20 DNA stellt die Erfindung ein Verfahren zur Verfügung, dass die Bindungskapazität und -effizienz des Proteins erhöht und somit eine verbesserte Trennung und/oder Anreicherung nicht-methylierter DNA aus einem Gemisch von methylierter DNA und nicht-methylierter DNA ermöglicht.

25 Erfindungsgemäß wird dies durch die indirekte Kopplung des Proteins an die Matrix erreicht. Dieses Verfahren wird nachfolgend unter Bezugnahme auf die Figuren 9 und 10 beschrieben.

Zur Steigerung der Bindungskapazität und -effizienz des CpGbP-181-Proteins für nicht-methylierte CpG-Motive enthaltende DNA ist Gegenstand der Erfindung die indirekte Bindung
30 des Proteins an die Matrix über einen Spacer. Durch die Kopplung des Proteins über einen Spacer an die Matrix wird der Grad der Beweglichkeit sowie die Anzahl der freien Bindungsstellen des CpGbP-181-Proteins erhöht. Dadurch wird eine Steigerung der Bindungskapazität- und effizienz erreicht. Weiterhin kann dadurch die Menge des eingesetzten Proteins reduziert werden.

35

Als Spacer im Sinne dieser Erfindung werden kurze kettenartige Moleküle verstanden, welche einen räumlichen Abstand zwischen Matrix und dem erfindungsgemäß eingesetzten Protein, z. B. CpGbP-181-Protein, ermöglicht. Solche Spacer sind dem Fachmann bekannt, z. B. von der

Affinitätschromatographie oder der Immobilisierung von Proteinen. Solche kettenartige Moleküle sind aus C- und H-Atomen sowie ggf. Heteroatomen, z. B. N, aufgebaut. Diese kettenartigen Moleküle sind aus einzelnen Kettengliedern auf der Basis der C-Atome z. B. CH₂ und ggf. vorhandenen Heteroatomen, z. B. NH aufgebaut. Der Spacer weist insbesondere 4 bis 20, vorzugsweise 7 bis 10, Kettenglieder auf. Ein besonders bevorzugter Spacer leitet sich von Diaminhexan (NH₂-(CH₂)₆-NH₂) ab. Antikörper sind im Sinne der vorliegenden Erfindung nicht als Spacer zu betrachten.

Als Matrix im Sinne dieser Erfindung werden Substanzen bezeichnet, die als Träger für Spacer und Protein fungieren. Trägermaterialien können beispielsweise Sepharose, Perlzellulose, Silica o. ä. dem Fachmann bekannte Substanzen sein.

Als Körperflüssigkeiten im Sinne der Erfindung werden alle vom Körper eines Säugers, einschließlich Mensch, stammenden Flüssigkeiten verstanden, insbesondere solche in denen Krankheitserreger vorkommen können, wie z. B. Blut, Urin, Liquor, Pleural-, Perikardial-, Peritoneal- sowie Synovialflüssigkeit. Die auf humanes Blut bezogene Beschreibung der Erfindung stellt keine Einschränkung sondern nur eine beispielhafte Anwendung dar.

Unter bakteriellen Erregern werden vorzugsweise Erreger einer Sepsis, aber auch alle anderen bakteriellen Erreger von Infektionen verstanden. Sie können sich dabei von kommensalen Erregern unterscheiden, die zur normalen Besiedlung des Organismus gerechnet werden und gelegentlich auch in Untersuchungsproben von Patienten gefunden werden, aber keine klinische Bedeutung haben.

Bei der Isolierung der Gesamt-DNA aus infizierten Körperflüssigkeiten kann das Verhältnis Wirts-DNA zur Erreger-DNA oft nur 1:10⁻⁶ bis 1:10⁻⁸ oder sogar noch weniger betragen. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht durch die spezifische Bindung prokaryonten DNA an das erfindungsgemäße Protein eine Anreicherung um 1 Potenzeinheit und mehr.

Das erfindungsgemäß eingesetzte Protein kann direkt oder indirekt an den Träger gekoppelt sein. Die Art der Kopplung hängt von dem Träger und dem Trägermaterial ab. Als Träger kommen dabei insbesondere Membranen, Mikropartikel und Harze oder ähnliche Materialien für Affinitätsmatrices in Frage. Geeignete Materialien zur Anbindung des erfindungsgemäßen Proteins, sowie – abhängig von der Art des Materials – die Durchführung der Anbindung, sind dem Fachmann hinlänglich bekannt. Für die indirekte Kopplung eignen sich beispielsweise spezifische Antikörper gegen das erfindungsgemäße Protein oder das Polypeptid, die ihrerseits durch bekannte Verfahren an den Träger gebunden sind.

Eine Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht in der Anreicherung prokaryonter DNA. Eine weitere Anwendung besteht in der Trennung von prokaryonter DNA aus einem Gemisch eukaryonter und prokaryonter DNA durch die Bindung der prokaryonten DNA an das erfindungsgemäß eingesetzte Protein, welches z.B. an eine Matrix immobilisiert wurde. Das

5 Gemisch aus körpereigner und prokaryonter DNA wird mittels geeigneter Verfahren mit der Affinitätsmatrix in Verbindung gebracht, und dabei wird die prokaryonte DNA an das immobilisierte erfindungsgemäße Protein gebunden; die eukaryonte DNA durchläuft zum Beispiel eine Trennsäule und kann separat gesammelt werden. Affinitätsmatrices können beispielsweise polymere Polysaccharide, wie Agarosen, andere Biopolymere, synthetische

10 Polymere, oder Träger mit Silikat-Grundgerüst, wie poröse Gläser oder sonstige feste oder flexible Träger, sein, an welchen das erfindungsgemäß eingesetzte DNA-bindende Protein immobilisiert wird. Nach erfolgter Trennung prokaryonter von eukaryonter DNA wird die Affinitätsmatrix mit einem geeigneten Reagenz gespült, so daß entweder das Bindungsprotein mit der gekoppelten prokaryonten DNA von der Matrix und/oder die prokaryonte DNA von dem

15 Bindungsprotein getrennt wird und für weitere Arbeitsschritte in ausreichender Menge zur Verfügung steht.

Eine weitere Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht in der Trennung und Anreicherung prokaryonter DNA von eukaryonter DNA durch Bindung der prokaryonten DNA an

20 das erfindungsgemäße Protein welches an Mikropartikeln immobilisiert wurde. Hierbei kommen alle Mikropartikel in Frage, die eine Immobilisierung des DNA-bindenden erfindungsgemäßen Proteins ermöglichen. Solche Mikropartikel können aus Latex, Kunststoff (z. B. Styropor, Polymer), Metall oder ferromagnetischen Stoffen bestehen. Weiterhin können auch fluoreszierende Mikropartikel, wie sie beispielsweise von der Firma Luminex angeboten werden,

25 verwendet werden. Nachdem die prokaryonte DNA an die an Mikropartikel immobilisierten erfindungsgemäß eingesetzten Proteine gebunden wurde, werden die Mikropartikel mit geeigneten Methoden, wie beispielsweise Filtration, Zentrifugation, Fällung, Sortierung über Messung der Fluoreszenzintensität oder magnetische Verfahren, von dem Stoffgemisch getrennt. Die prokaryonte DNA steht nach Trennung von den Mikropartikeln zur weiteren

30 Verarbeitung zur Verfügung.

Eine andere Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht in der Trennung und Anreicherung prokaryonter DNA von eukaryonter DNA durch Bindung der prokaryonten DNA an das erfindungsgemäß eingesetzte Protein, welches anschließend durch Elektrophorese von

35 übrigen Bestandteilen des Gemisches getrennt wird.

Eine weitere Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht in der Trennung und Anreicherung prokaryonter DNA von eukaryonter DNA durch Bindung der prokaryonten DNA an

das erfindungsgemäß eingesetzte Protein, wobei das erfindungsgemäße Protein anschließend an entsprechende Antikörper gebunden wird. Die Antikörper können an feste oder flexible Substrate, z. B. Glas, Kunststoffe, Silizium, Mikropartikel, Membranen gebunden sein, oder sich in Lösung befinden. Nach Bindung der prokaryonten DNA an das erfindungsgemäße Protein und dessen Bindung an den spezifischen Antikörper erfolgt die Trennung aus dem Stoffgemisch mit dem Fachmann bekannten Methoden.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch zur Reinigung von Körperflüssigkeiten von prokaryonter DNA eingesetzt werden. Hierbei ist es zweckmäßig, daß die Separation extrakorporal unter sterilen Bedingungen erfolgt, damit die Körperflüssigkeiten wieder in den Körper zurückgeführt werden können, so daß das körpereigene Immunsystem bei der Beseitigung von Infektionen unterstützt wird, indem die sich in den Körperflüssigkeiten befindende prokaryonte DNA entfernt wird.

Bei der extrakorporalen Entfernung der prokaryonten DNA aus Körperflüssigkeiten kommen alle geeigneten chemischen, mechanischen oder elektrochemischen Verfahren in Betracht. Weiterhin stellt auch die Kombination mit anderen extrakorporalen Verfahren, wie Hämo-perfusion, Herz-Lungen-Maschine oder Endotoxin-Adsorber, eine weitere zweckmäßige Anwendung dar.

Das erfindungsgemäß eingesetzte Protein kann auch zur Detektion prokaryonter DNA eingesetzt werden. Hierbei schließt sich nach der Anreicherung der prokaryonten DNA ein Schritt zur Amplifikation der prokaryonten DNA an, wozu sich alle gängigen Amplifikationsmethoden eignen (PCR, LCR, LM-PCR etc.).

Das erfindungsgemäße Verfahren, insbesondere mit den vorstehend beschriebenen Ausführungsformen hat den Vorteil, daß durch spezifische Bindung nicht-methylierter CpG-motiv-reicher prokaryonter DNA an Proteine mit spezifischer Affinität für solche Strukturen eine Konzentrierung prokaryonter DNA aus der Gesamt-DNA eines infizierten Wirts gelingt und damit die Nachweisempfindlichkeit für Verfahren zum Nachweis von Erreger-DNA in Körperflüssigkeiten stark erhöht wird.

Die Abtrennungsmöglichkeiten prokaryonter DNA von eukaryonter DNA mit einem spezifisch bindenden Protein sind nicht zeitaufwendiger als bekannte Methoden zur Isolierung von Gesamt-DNA. Der nachfolgende DNA-Nachweis kann über eine PCR-Reaktion erfolgen. Eine nested PCR wird in den meisten Fällen nicht notwendig sein, so daß eine beträchtliche Zeitersparnis in der Diagnostik möglich wird.

Bereits vorstehend wurde angesprochen, das erfindungsgemäß eingesetzte Protein zur Abreicherung prokaryontischer DNA in physiologischen Körperflüssigkeiten einzusetzen. Abreicherung im Sinne der vorliegenden Erfindung bedeutet dabei, daß die Menge der prokaryontischen DNA verringert wird. Diese Möglichkeit zur Verringerung der prokaryontischen DNA ermöglicht es auch, die erfindungsgemäßen Proteine in der Umwelttechnik, der
5 Abwasserwirtschaft und der Klimatechnik einzusetzen

Die Erfindung betrifft außerdem ein Verfahren zur Trennung und Anreicherung von nichtmethylierte genomischer DNA aus einem Gemisch von nicht-methylierter genomischer und
10 methylierter genomischer DNA. Durch die Bindung der nicht-methylierten genomischen DNA an das an eine Matrix gekoppelte CpGbP-181-Protein wird die methylierte genomische DNA abgetrennt. Diese Verfahrensweise trägt wesentlich zur vereinfachten Untersuchung der Methylierungsmuster von methylierter genomischer DNA bei und ermöglicht die Diagnose von Krankheiten, die ein spezifisches Methylierungsmuster aufweisen.

15 Die Erfindung betrifft darüber hinaus einen Kit zur Anreicherung prokaryonter DNA mittels eines der vorstehend beschriebenen Verfahren, in dem zumindest das erfindungsgemäße Protein gegebenenfalls zusammen mit weiteren geeigneten Reagenzien zur Verfahrensdurchführung enthalten sind.

20 Der Kit kann neben dem erfindungsgemäßen Protein mindestens ein Set von Primern, welche zur Amplifikation genomischer DNA bestimmter Prokaryonten unter Standardbedingungen geeignet sind, enthalten.

25 Die Erfindung wird nachfolgend anhand der Beispiele noch näher erläutert, ohne sie aber darauf einzuschränken.

Beispiel 1: Herstellung des erfindungsgemäßen Proteins

30 Aus der DNA Sequenz für das komplette CPGbP Protein wurden die Primer 1 (GGATCCGGTGGAGGGCGCAAGAGGCCTG -fw SEQ ID Nr. 3) und 2 (AAGCTTAGAGGTAGGTCCTCAT-CTGAG-rv SEQ-ID Nr. 4) konstruiert, die ein verkürztes DNA-Fragment amplifizieren, das für ein verkürztes CPG-bindendes Protein, CPGbP181, kodiert. Das DNA-Fragment wurde nach Spaltung mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und
35 *Hind III* in den Vektor pQE9 (Qiagen) ligiert. In pQE9 entsteht ein offener Leserahmen, in dem an das 5' Ende ein für 6 x His-Tag kodierendes DNA Fragment fusioniert wird (pQE9[6HisCPGbP181]). Die vollständige Aminosäuresequenz des kodierenden

Fusionsproteins 6His-CPGbP181 ist nachfolgend gezeigt, wobei der fett gedruckte Abschnitt das Peptid CPGbP181 repräsentiert und die schräggedruckten Abschnitte fusionierte Fremdaminosäuren vom Plasmid pQE9 anzeigen.

5

Das Plasmid pQE9[6HisCPGbP181] wurde in den *E. coli* Expressionsstamm M15[pREP4] (Qiagen) transformiert. Der Klon wird im weiteren M15[pCPGbP181] bezeichnet und das exprimierte Protein rCPGbP181. Die Expression des Proteins rCPGbP181 erfolgte nach folgendem Protokoll: Eine Kolonie des Expressionsstammes M15[pCPGbP181] wird in 2 ml
10 Luria Medium mit 100µg/ml Ampicillin und 25µg/ml Kanamycin bei 37°C unter Schütteln über Nacht angezüchtet. Anschließend wird die Vorkultur in 200 ml vorgewärmtes Nährmedium, das die gleichen Antibiotikakonzentrationen enthält, überführt. Nach 3 Stunden Wachstum bei 37°C unter Schütteln wird IPTG zur Induktion der Expression zugegeben und weitere 5 Stunden inkubiert. Danach werden die Bakterien abzentrifugiert und das Sediment in 5 ml 0.2 M
15 Trispuffer, pH 7.5 resuspendiert. Die Bakterien werden im Eisbad 5 x 1 min mit Ultraschall behandelt. Nach der Zentrifugation wird das Sediment in 10 ml 0.2 M Tris, 2M Harnstoff, pH7.5 resuspendiert und 15 min geschüttelt. Nach erfolgter Zentrifugation wird das verbliebene Sediment in 0.2 M Tris, 6M Guanidinhydrochlorid, 0.001 M Dithioeritrit (DTE), 0.02 M Imidazol aufgenommen und suspendiert. Die Inclusionbodies werden unter Agitation für 1 Stunde bei
20 Raumtemperatur gelöst. Nach Zentrifugation befindet sich das Rohprotein im Überstand und kann direkt auf eine 3 ml Ni-Agarosesäule aufgetragen werden. Die nächsten Schritte sollten im Kühlraum bei +4 bis +6°C erfolgen. Zunächst wird die Säule mit 0.2 M Tris, 6M Guanidinhydrochlorid, 0.001 M Dithioeritrit (DTE), 0.02 M Imidazol Puffer, pH7.5 gewaschen bis die Extinktion die Nulllinie erreicht hat. Von hier aus kann rCPGbP181 auf verschiedenen
25 Wegen gewonnen werden: 1. Als denaturiertes Protein gelöst in 6M Guanidinhydrochlorid oder 6 M Harnstoff und 2. als natives Protein löslich in Puffern physiologischer Konzentration. Im 2. Fall ist die Ausbeute aber geringer.

Reinigung nach Methode 1 (denaturiert):

30 Das Protein rCPGbP181 wird von der Ni-NTA Agarose mit einem Imidazolgradienten von 0 – 0.5 M eluiert in dem Puffer 0.2 M Tris, 6M Guanidinhydrochlorid, 0.001 M Dithioeritrit (DTE), 0.02 M Imidazol, pH7.5 als Grundlage. Dabei wird rCPGbP181 bei 0.2 – 0.3 M Imidazol von der Säule abgelöst. Das so gewonnene Protein wird gegen 0.2 M Tris, 6M Harnstoff, 0.001 M Dithioeritrit (DTE), pH7.5 dialysiert und eingefroren. Bei Dialyse gegen physiologische Puffer
35 fällt so gereinigtes rCPGbP181 aus.

Reinigung nach Methode 2 (nativ):

Nach dieser Methode wird die Guanidinhydrochlorid Konzentration von 6 molar auf der Ni-NTA Agarose mit dem gebundenem rCPGbP181 über einen Gradienten auf 0 molar Guanidinhydrochlorid gebracht. Grundlage ist der Puffer 0.2 M Tris, 0.5 M NaCl, 0.001 M Dithioeritrit (DTE), 0.02 M Imidazol, pH7.5. Hier wählten wir die Flussgeschwindigkeit von 0.5 ml/min. Danach wurde zur Elution ein Imidazolgradient von 0 bis 0.5 molar angelegt in Puffer 0.2 M Tris, 0.5 M NaCl, 0.001 M Dithioeritrit (DTE), pH7.5 als Grundlage. Auch hier wurde ein wesentlicher Anteil des gebundenen Proteins (20%) bei 0.2 bis 0.3 molar Imidazol eluiert. Dieses native rCPGbP181-Eluat blieb in diesem Puffer gelöst, auch nach Dialyse in PBS. Von Nachteil ist aber, dass ca. 80% des an Ni-NTA Agarose gebundenen rCPGbP181 unter diesen Bedingungen auf der Säule verblieben und nachträglich nur unter den denaturierenden Bedingungen von Methode 1 noch gewonnen werden konnten. Das heißt, die Ausbeute der verwendeten Methode 2 ergab nur 20% natives, in physiologischen Puffern lösliches rCPGbP181.

15

Beispiel 2: Erregernachweis mittels nested PCR:

Frisches, heparinisiertes Humanblut, das *Streptococcus pyogenes* mit 10^3 /ml koloniebildende Einheiten als Erreger enthält, wird für den Erregernachweis verwendet. Die DNA wird mittels Absorption an DNA bindende Matrix mit kommerziellen Kits zur Isolierung von Gesamt-DNA aus Körperflüssigkeiten nach abgewandelter Vorschrift der Hersteller isoliert. Dazu werden 100 µl infiziertes Blut in Eppendorf Tubes mit 200 µl des Totallysispuffers versetzt, der Proteinase K und SDS enthält. Das Gemisch wird 30 min bei 37°C inkubiert, und danach 20 min auf 95°C erhitzt. Nach dem Abkühlen werden 20 µg Mutanolysin zugegeben und weitere 60 min bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation wird das Gemisch auf die Zentrifugationssäulchen mit DNA-bindender Matrix aufgetragen und die DNA nach Vorschrift des Herstellers gereinigt. Die gereinigte DNA wird in einem Endvolumen von 100 µl 0.01 molar Trispuffer, pH 7.5 oder in gleicher Menge Elutionpuffer des Herstellers aufgenommen. Für den Erregernachweis wurden Primer zur Identifizierung des Streptolysin O Gens (slo) konstruiert.

30

1. PCR. Amplifikation eines 465 bp Fragmentes

Forward-Primer 1: 5'-AGCATACAAGCAAATTTTTTACACCG

Reverse-Primer 2: 5'- GTTCTGTTATTGACACCCGCAATT

Primer Konzentration 1mg/ml

Ansatz: 5µl DNA-Isolat

35

0.5 µl Primer fw 1

0.5µl Primer rv 2

14µl Aqua dest

total 25 µl in Ready to go Kit (Amersham-Pharmacia)

Reaktion:

5 min 95 °C

Zyklen 40 (30 sec. 95°C, 30 sec 51° C, 3 min 72°C, 1 x 7min 72°C)

5

In Figur ist 1. PCR von Streptokokken-DNA in Humanblut dargestellt (je 10 µl des 25 µl Ansatzes aufgetrennt: 1)PCR Ansatz mit 5 µl Template DNA; 2) Ansatz mit 5µl Template, 1 : 10 verdünnt. 3) Positivkontrolle: 0.2 µl Streptokokken-DNA als Template ohne Anwesenheit eukaryotischer DNA aus Blut. ST) Molekulargewichtsstandard)

10

Ergebnis: Die 1. Primär PCR ergibt keine positive Reaktion. Deshalb wurde nachfolgend eine 2. PCR (nested PCR) durchgeführt.

2: PCR, nested PCR. Amplifikation eines 348 bp Fragmentes innerhalb des obigen s/o-Fragments

15

Forward Primer 3: 5'- CCTTCCTAATAATCCTGCGGATGT

Reverse Primer 4: 5'- CTGAAGGTAGCATTA/G TCTTTGATAACG

Primer-Konzentration: 1mg/ml

20

Ansatz: 5µl aus PCR1, Probe 1, Abb. 1

0.5 µl Primer fw 1

0.5µl Primer rv 2

14µl Aqua dest

25

total 25 µl in Ready to go Kit (Amersham-Pharmacia)

Reaktion:

5 min 95 °C

Zyklen 40 (30 sec. 95°C, 30 sec 54° C, 3 min 72°C, 1 x 7min 72°C)

30

In Figur 4 ist die nested PCR mit den PCR-Produkten aus dem Primär PCR-Ansatz in Figur 3 als Template gezeigt. Die Proben entsprechen denen aus Figur 3.

Ergebnis: In der nested PCR wird das gewünschte slo-DNA Fragment amplifiziert bei einer Konzentration von 100 Streptokokkenzellen pro 100 µl Blut (Probe 1). Das entspricht bei 5µl Einsatz in der 1. PCR (Fig. 3) ca 5 bis 10 Templates. Bei einer 1:10 Verdünnung (Probe 2) ist die Empfindlichkeit erschöpft (0,5 bis 1 Template).

35

Aus diesen Versuchen ist ersichtlich, dass für einen erfolgreichen PCR-Nachweis von Erregern im Blut die Gesamt-DNA aus mindestens 1 bis 5 ml Blut isoliert werden muss. Die Gesamt-DNA-Konzentration ist dann aber zu groß, um dann direkt in einer PCR eingesetzt zu werden.

5

Andere erregerspezifische Nukleinsäurenachweise ohne Amplifikationsschritt durch direkte Detektion der bakteriellen DNA z.B. mittels DNA Hybridisierung sind ebenfalls zu unempfindlich, was vor allem am hohen Überschuss von humaner DNA gegenüber bakterieller DNA liegt. Hierbei sind zudem kompetitive Prozesse bei der DNA-Analyse sowie die geringe Menge an bakterieller DNA als hinderlich für eine qualitative und quantitative Analyse anzusehen. Die üblichen Methoden zur DNA-Isolierung reichern die Gesamt-DNA einer Körperflüssigkeit an, sodass das Verhältnis Wirts-DNA zu mikrobieller DNA zwischen $1 : 10^{-6}$ und $1 : 10^{-8}$ betragen kann. Aus diesem Unterschied ist die Schwierigkeit des Nachweises mikrobieller DNA in Körperflüssigkeiten gut nachzuvollziehen.

15

Beispiel 3: Ermittlung der Bindungseigenschaften von rCPGbP181:

In Gelretardierungsexperimenten wurde sowohl die Bindung des denaturierten als auch die des nativen Proteins rCpGbP181 an methylierte und nicht-methylierte DNA-Moleküle mit CpG Motiven untersucht. Als Test DNA wurde das *E. coli* Plasmid pUC18 verwendet mit einem inserierten M-Proteingensegment von *Streptococcus dysgalactiae* *supsp. equisimilis* (Geyer et. al. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 26:11-24, 1999). Die Plasmidpräparation wurde geteilt und die eine Hälfte mit dem CpG-Methylase Kit von New England BioLabs methyliert. Beide Präparationen wurden mit rCPGbP181 (nativ oder denaturiert) gemischt und im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Ergebnisse sind in den Figuren 5 und 6 einzusehen. Sowohl rCPGbP181 in nativer als auch in denaturierter Form zeigte höhere Affinität zur nichtmethylierten Plasmid-DNA, was die selektive Bindungseigenschaft für nichtmethylierte CpG-reiche DNA bestätigt.

30

Beschreibung des Gelretardierungsexperiments gemäß Figur 5: Je 5 µl (72 ng) methylierte und 1 µl (142 ng) nicht methylierte pUC18*emm* DNA wurden mit 5 µl (0.5 µg) nativem rCPGbP181 gemischt und auf ein Volumen von 35 µl mit dem Puffer: 0.01M Tris, 0.08M NaCl, 0.001M EDTA, 0.005M DTE, 5% Glycerin, pH7.8 aufgefüllt. Nach 30 min Inkubation bei 20°C wurden die Gemische elektrophoretisch in 1.5%iger Agarose aufgetrennt. In Lanes 1 und 3 wurde methylierte DNA und in Lanes 2 und 4 nichtmethylierte DNA aufgetragen. In Lanes 1 und 2 wurde die DNA mit nativem rCPGbP181 gemischt. Lane 2 zeigt, dass nichtmethyliertes pUC18*emm* mit rCPGbP181 interagiert, keine Wechselwirkung zeigte dagegen rCPGbP181 mit

35

methyliertem pUC18*emm* (Lane1). Lanes 4 und 5 sind die Plasmide ohne Zusatz von rCPGbP181 als Kontrollen.

Beschreibung des Gelretardierungsexperiment aus Figur 6 von nicht methyliertem und
5 methyliertem pUC18*emm* nach Inkubation mit denaturiertem rCPGbP181. Die Konzentrationen entsprechen denen von Figur 5. In Lanes 1 und 3 wurde methylierte DNA und in Lanes 2 und 4 nichtmethylierte DNA aufgetragen. In Lanes 1 bis 4 wurde die DNA mit zwei verschiedenen Chargen von denaturiertem rCPGbP181 gemischt. Lanes 2 und 4 zeigen, dass nichtmethyliertes pUC18*emm* auch mit denaturiertem rCPGbP181 interagiert, keine
10 Wechselwirkung zeigte dagegen rCPGbP181 mit methyliertem pUC18*emm* (Lanes 1 und 3). Lane 5 pUC18*emm* ohne rCPGbP181 als Kontrolle.

Beispiel 4: Bindung und Trennung eines Gemisches von Kalbsthymus-DNA und bakterieller
15 DNA an immobilisiertes CPGBp181.

Gereinigtes CPGBp181 wurde mittels Glutaraldehyd an Aminoethyl-Sepharose (Amersham-Biosciences) gekoppelt nach der Vorschrift von Cambiasso et al. (Cambiasso, C. et al.,
Immunochimistry 12:273-278, 1975) gekoppelt. Die immobilisierte Proteinkonzentration betrug
20 0.3 mg pro Milliliter Sepharose. 300 µl Sepharose wurden in ein Spin-Filter Röhrchen gegeben mit innertem Frittenmaterial, das weder DNA noch Protein absorbiert, aber die Sepharose zurückhält.

200 ng Kalbsthymus-DNA und 25 ng pUC18*emm* wurden in 100 µl 20 mM Tris-HCL Puffer, pH
25 7.5 gelöst und auf das so präparierte Säulchen gegeben. Nach jedem Schritt wurde die Flüssigkeit 0,5 min bei 14 000 RPM in einer Eppendorffzentrifuge in je ein frischen Eppendorfröhrchen zentrifugiert. So wurde in zweier Schritten die NaCl-Konzentration erhöht von 0 auf 1M. In jedem Röhrchen wurde eine DNA-Fällung durchgeführt indem 10 µl 4 M Acetat, pH4,5 und 250 µl abs. Ethanol zugegeben wurden, gemischt und 15 min bei 14 000
30 RPM zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgegossen und das Präzipitat mit 300 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Nach Abgießen wurde der Rückstand 5 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in 15 µl dest. Wasser (PCR-tauglich) aufgenommen. Zum einen wurde die Extinktion bei 254 nm von je 10 µl der Proben gemessen (Figur 7). Zum anderen wurde mit je 3 µl jeder Probe eine PCR mit Sequenzprimern für PUC18
35 durchgeführt (Figur 8).

Das Ergebnis (Figur 7,8) zeigt, daß die eukaryotische Kalbsthymus-DNA am Anfang zwischen 0 bis 0,1 M NaCl von der Säule gewaschen wird, während die prokaryotische DNA (pUC18*emm*)

in der Fraktion bei 0.3 M NaCl eluiert wurde. Das zeigt, eukaryotische DNA eine niedrigere Affinität zu CpGbP181 aufweist und somit eine eindeutige Trennung beider DNA-Fractionen erreicht wurde.

5

Beispiel 5: Steigerung der Bindungseigenschaften des CpG-bP-181-Proteins, die aus der indirekten Bindung dieses Proteins über einen Spacer an eine Matrix resultieren.

10 Zur Untersuchung der Bindungseigenschaften wurde prokaryonter DNA aus DNA-Gemisch von *Staphylococcus aureus* und humaner DNA unter Verwendung des direkt gekoppeltem CpGbP-181-Proteins an CNBr-Sepharose bzw. unter Verwendung des indirekt über einen Diaminohexyl-Spacer (AH) gekoppeltem CpGbP-181-Proteins an Sepharose (im folgenden AH-Sepharose) angereichert.

15 Zunächst wurde die AH-Sepharose nach Zugabe von Glutaraldehyd 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die AH-Sepharose mit 0,1 molarem Na_2HPO_4 gewaschen. Jetzt wurden 0,24 mg des CpGbP-181-Proteins auf die Matrix gegeben. Die Bindung des CpGbP-181-Proteins an die AH-Sepharose wurde durch eine Inkubation während 2 Stunden bei Raumtemperatur erreicht. Das überschüssige CpGbP-181-Protein
20 wurde entfernt.

Nach anschließendem Waschen der CpGbP-181-AH-Sepharose mit 0,1 molarem Na_2HPO_4 und Zugabe von 0,1 molarem Glycin, wurde die CpGbP-181-AH-Sepharose zur Absättigung freier Bindungsstellen 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde wiederum die
25 CpGbP-181-AH-Sepharose mit 0,1 molarem Na_2HPO_4 gewaschen. Zur Reduktion der Schiff'schen Base und Stabilisierung der Bindung wurde die CpGbP-181-AH-Sepharose mit Natriumborhydrid versetzt und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

30 Danach wurde die CpGbP-181-AH-Sepharose mit 0,1 molarem Na_2HPO_4 gewaschen.

Die Lagerfähigkeit der CpGbP-181-AH-Sepharose bei 4°C wird durch Zugabe von 20% Ethanol erreicht. Danach wurde die CpGbP-181-AH-Sepharose in Säulen portioniert. Die mit der CpGbP-181-AH-Sepharose präparierten Säulen wurden anschließend mit TRIS-Puffer gewaschen und standen für die Trennung/Anreicherung von nicht-methylierte CpG-Motive
35 enthaltende DNA zur Verfügung.

2) Anreicherung des DNA-Gemisches, anschließende Elution der prokaryonten DNA und Konzentrationsbestimmung der prokaryonten DNA durch PCR

Als DNA-Gemisch bestand jeweils aus 330 ng humaner DNA bzw. 150 ng prokaryonter DNA (*Staphylococcus aureus* DNA). Die DNA-Gemische wurde auf die mit CNBr-Sepharose bzw. mit AH-Sepharose präparierten Säulen gegeben und 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert.

5 Danach wurden die Säulen zentrifugiert und mit 100 µl TRIS-Puffer (10 µM, pH 7) gewaschen. Der Wasch- und Zentrifugationsschritt wurde 5 mal wiederholt.

Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und anschließend jeweils 100 µl Elutionspuffer (10 µM TRIS-Puffer, 0,5 M NaCl, pH 7) auf die Säulen gegeben und zentrifugiert. Der

10 Elutionsschritt wurde 5 mal wiederholt. Jetzt wurden die einzelnen Fraktionen jeder Probe durch Zugabe von 10 µl 3 M Natriumacetat und 250 µl Ethanol mit anschließendem Mischen und Zentrifugieren (15 min bei 15000g) gefällt. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen und das Pellet mit 1 µl Ethanol (70%) gewaschen und 5 Minuten bei 15000 g zentrifugiert. Anschließend wurde wieder der Überstand entfernt, das Pellet in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 30

15 µl DEPC-Wasser aufgenommen. Hiervon wurden jeweils 5 µl für den PCR-Nachweis verwendet.

Für die PCR wurden Universalprimer für das 16s RNA Gen verwendet. Nach Durchführung der PCR wurden jeweils 15 µl der einzelnen Fraktionen auf ein 2%-iges Agarosegel gegeben.

20

Figur 9 (direkte Bindung des CpG-181 Proteins an CNBr- Sepharose) und Figur 10 (indirekte Bindung des CpG-181 Proteins über eine Spacer (AH) an Sepahrose) zeigen die Ergebnisse der PCR für die einzelnen Fraktionen. Es zeigt sich deutlich, dass durch die Verwendung des AH-Spacer mehr prokayronte DNA angereichert werden konnte (Fraktion 1, Elutionsfraktion).

25 Diese charakteristische Verbesserung der Bindungseigenschaften ist für die erfindungsgemäßen Verfahren ausnutzbar.

Patentansprüche

- 5 1. Verfahren zur Trennung und/oder Anreicherung prokaryonten DNA mit den Schritten:
- a. Kontaktieren mindestens einer in Lösung befindlichen prokaryonten DNA mit einem spezifisch prokaryonte DNA bindenden Protein, dass eine 25%ige bis 35%ige Homologie zum Wildtyp-CGPB-Protein aufweist, wodurch ein Protein-DNA-Komplex gebildet wird, und
- 10 b. Separation des Komplexes.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Protein die Aminosäuresequenz gemäß SEQ-ID No.2 aufweist.
- 15 3. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei das Protein in der Lage ist, nichtmethylierte CpG-Motive zu erkennen.
4. Verfahren gemäß einem der vorgegangenen Ansprüche, wobei sich an die Separation ein Schritt zur Abtrennung der DNA vom Protein aus dem Komplex anschließt.
- 20 5. Verfahren gemäß einem der vorgegangenen Ansprüche, wobei das Protein an einen Träger gebunden ist.
6. Verfahren gemäß Anspruch 5, wobei das Protein direkt an den Träger gebunden ist.
- 25 7. Verfahren gemäß Anspruch 5, wobei das Protein über einen dagegen gerichteten Antikörper an den Träger gebunden ist.
8. Verfahren gemäß Anspruch 5, wobei das Protein über einen Spacer an den Träger
- 30 gebunden ist.

9. Verfahren gemäß Anspruch 8, wobei ein Diaminohexan-Rest als Spacer verwendet wird.
10. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 5-8, wobei der Träger als Matrix, Mikropartikel
5 oder Membran ausgebildet ist.
11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei als Matrix Sepharose verwendet wird.
12. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Separation mittels
10 eines gegen das Protein gerichteten Antikörper oder Antiserum erfolgt.
13. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1-11, wobei die Separation mittels Elektrophorese erfolgt.
14. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 6 bis 13, wobei das Protein ein gegen nicht-
15 methylierte CpG-Motive gerichteter Antikörper oder ein entsprechendes Antiserum ist.
15. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Lösung ein Gemisch
aus eukaryonter und prokaryonter DNA enthält.
20
16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei es sich bei der prokaryonten DNA um bakterielle
DNA handelt.
17. Verfahren gemäß Anspruch 15 oder 16, wobei die Lösung eine Körperflüssigkeit oder
25 davon abgeleitet ist, insbesondere Vollblut, Serum, Plasma, Zellpräparationen aus Vollblut,
Urin, Liquor, Pleural-, Perikardial-, Peritoneal-, Synovialflüssigkeit und bronchoalveoläre
Lavage.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 17, wobei die Separation mittels eines
30 Filters erzielt wird, welcher entsprechende DNA-Protein-Komplexe herausfiltert.
19. Verfahren nach Anspruch 18, wobei das Protein auf einer Filtermatrix immobilisiert ist.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 19 zur Anwendung in der Umwelttechnik, der
35 Wasser- und Abwasserwirtschaft sowie der Klimatechnik.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 19, wobei weiterhin nach Schritt b) als Schritt
c) die prokaryonte DNA amplifiziert wird.

22. Verfahren nach Anspruch 21, mit den Schritten:

- 5 a) Isolierung der prokaryonten DNA aus dem Protein DNA-Komplex,
- b) Denaturierung der doppelsträngige DNA,
- c) Hybridisierung der Einzelstränge der DNA mit komplementären Primern,
- d) Generierung von Doppelstrangfragmenten über Reaktion mit Polymerasen und
- e) Wiederholung dieser Schritte zum gewünschten Amplifikationsgrad.

10 23. Verfahren nach Anspruch 22, mit den Schritten:

- a) Klonierung der isolierten prokaryonten DNA-Sequenzen in Vektoren,
- b) Transformation geeigneter Wirtszellen mit diesen Vektoren,
- c) Kultivieren dieser transformierten Zellen,
- 15 d) Isolation der Vektoren aus diesen Zellen und
- e) Isolierung der DNA.

24. Kit zur Anreicherung und/oder Trennung prokaryonter DNA mittels eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 23.

20

25. Test-Kit zur Detektion prokaryonter DNA mittels eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 23 mit einem oder mehreren Sets spezifischer Primer.

1/13

		10	20	30	40	50
CPGbP656	1	MEGDGSDPEP	PDAGEDSKSE	NGENAPIYCI	CRKPDINCFM	IGCDNCNEWF
CPGbP241	1	-----	-----	-----	-----	-----
CPGbP181	1	-----	-----	-----	-----	-----
		60	70	80	90	100
CPGbP656	51	HGDCIRITEK	MAKAIREWYC	RECREKDPKL	EIRYRHKKSR	ERDGNERDSS
CPGbP241	51	-----	-----	-----	-----	-----
CPGbP181	51	-----	-----	-----	-----	-----
		110	120	130	140	150
CPGbP656	101	EPRDEGGGRK	RPVPDPNLQR	RAGSGTGVGA	MLARGSASPH	KSSPQPLVAT
CPGbP241	101	-----GGGRK	RPVPDPNLQR	RAGSGTGVGA	MLARGSASPH	KSSPQPLVAT
CPGbP181	101	-----GGGRK	RPVPDPNLQR	RAGSGTGVGA	MLARGSASPH	KSSPQPLVAT
		160	170	180	190	200
CPGbP656	151	PSQHHQQQQQ	QIKRSARMCG	ECEACRRTED	CGHCDFCRDM	KKFEGGPNKIR
CPGbP241	151	PSQHHQQQQQ	QIKRSARMCG	ECEACRRTED	CGHCDFCRDM	KKFEGGPNKIR
CPGbP181	151	PSQHHQQQQQ	QIKRSARMCG	ECEACRRTED	CGHCDFCRDM	KKFEGGPNKIR
		210	220	230	240	250
CPGbP656	201	QKCRLRQCQL	RARESYKYFP	SSLSPVTPSE	SLPRPRRPLP	TQQQPQPSQK
CPGbP241	201	QKCRLRQCQL	RARESYKYFP	SSLSPVTPSE	SLPRPRRPLP	TQQQPQPSQK
CPGbP181	201	QKCRLRQCQL	RARESYKYFP	SSLSPVTPSE	SLPRPRRPLP	TQQQPQPSQK
		260	270	280	290	300
CPGbP656	251	LGRIREDEGA	VASSTVKEPP	EATATPEPLS	DEDLPLDPDL	YQDFCAGAFD
CPGbP241	251	LGRIREDEGA	VASSTVKEPP	EATATPEPLS	DEDLPLDPDL	YQDFCAGAFD
CPGbP181	251	LGRIREDEGA	VASSTVKEPP	EATATPEPLS	DEDLPL----	-----
		310	320	330	340	350
CPGbP656	301	DNGLPWMSDT	EESPFLDPAL	RKRAVKVKHV	KRREKKSEKK	KEERYKRHRQ
CPGbP241	301	DNGLPWMSDT	EESPFLDPAL	RKRAVKVKHV	KRREKKSEKK	KEERYK----
		360	370	380	390	400
CPGbP656	351	KQKHKDKWKH	PERADAKDPA	SLPQCLGPGC	VRPAQPSSKY	CSDDCGMKLA
		410	420	430	440	450
CPGbP656	401	ANRIYEILPQ	RIQQWQQSPC	IAEEHGKKLL	ERIRREQQSA	RTRLQEMERR
		460	470	480	490	500
CPGbP656	451	FHELEAIIIR	AKQQAVREDE	ESNEGDSDDT	DLQIFCVSCG	HPINPRVALR
		510	520	530	540	550
CPGbP656	501	HMERCIYAKYE	SQTSFGSMYP	TRIEGATRLF	CDVYNPQSKT	YCKRLQVLCP
		560	570	580	590	600
CPGbP656	551	EHSRDPKVPA	DEVCGCPLVR	DVFELTGDFC	RLPKRQCNRH	YCWEKLRAE
		610	620	630	640	650
CPGbP656	601	VDLERVRVWY	KLDELFEQER	NVRTAMTNRA	GLLALMLHQT	IQHDPLTTDL
		660	670	680	690	700
CPGbP656	651	RSSADR.....

Fig. 1

2/13

Fig. 2

5'	ATG	GAG	GGA	GAT	GGT	TCA	GAC	CCA	GAG	CCT	CCA	GAT	GCC	GGG	GAG	GAC	AGC	AAG
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	M	E	G	D	G	S	D	P	E	P	P	D	A	G	E	D	S	K
	TCC	GAG	AAT	GGG	GAG	AAT	GCG	CCC	ATC	TAC	TGC	ATC	TGC	CGC	AAA	CCG	GAC	ATC
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	S	E	N	G	E	N	A	P	I	Y	C	I	C	R	K	P	D	I
	AAC	TGC	TTC	ATG	ATC	GGG	TGT	GAC	AAC	TGC	AAT	GAG	TGG	TTC	CAT	GGG	GAC	TGC
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	N	C	F	M	I	G	C	D	N	C	N	E	W	F	H	G	D	C
	ATC	CGG	ATC	ACT	GAG	AAG	ATG	GCC	AAG	GCC	ATC	CGG	GAG	TGG	TAC	TGT	CGG	GAG
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	I	R	I	T	E	K	M	A	K	A	I	R	E	W	Y	C	R	E
	TGC	AGA	GAG	AAA	GAC	CCC	AAG	CTA	GAG	ATT	CGC	TAT	CGG	CAC	AAG	AAG	TCA	CGG
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	C	R	E	K	D	P	K	L	E	I	R	Y	R	H	K	K	S	R
	GAG	CGG	GAT	GGC	AAT	GAG	CGG	GAC	AGC	AGT	GAG	CCC	CGG	GAT	GAG	GGT	GGA	GGG
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	E	R	D	G	N	E	R	D	S	S	E	P	R	D	E	G	G	G
																G	G	G
	CGC	AAG	AGG	CCT	GTC	CCT	GAT	CCA	AAC	CTG	CAG	CGC	CGG	GCA	GGG	TCA	GGG	ACA
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	R	K	R	P	V	P	D	P	N	L	Q	R	R	A	G	S	G	T
	R	K	R	P	V	P	D	P	N	L	Q	R	R	A	G	S	G	T
	GGG	GTT	GGG	GCC	ATG	CTT	GCT	CGG	GGC	TCT	GCT	TCG	CCC	CAC	AAA	TCC	TCT	CCG
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	G	V	G	A	M	L	A	R	G	S	A	S	P	H	K	S	S	P
	G	V	G	A	M	L	A	R	G	S	A	S	P	H	K	S	S	P
	CAG	CCC	TTG	GTG	GCC	ACA	CCC	AGC	CAG	CAT	CAC	CAG	CAG	CAG	CAG	CAG	CAG	ATC
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Q	P	L	V	A	T	P	S	Q	H	H	Q	Q	Q	Q	Q	Q	I
	Q	P	L	V	A	T	P	S	Q	H	H	Q	Q	Q	Q	Q	Q	I
	AAA	CGG	TCA	GCC	CGC	ATG	TGT	GGT	GAG	TGT	GAG	GCA	TGT	CGG	CGC	ACT	GAG	GAC
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	K	R	S	A	R	M	C	G	E	C	E	A	C	R	R	T	E	D
	K	R	S	A	R	M	C	G	E	C	E	A	C	R	R	T	E	D

3/13

Fig. 2 (Fortsetzung)

		549			558			567			576			585			594
TGT	GGT	CAC	TGT	GAT	TTC	TGT	CGG	GAC	ATG	AAG	AAG	TTC	GGG	GGC	CCC	AAC	AAG
C	G	H	C	D	F	C	R	D	M	K	K	F	G	G	P	N	K
C	G	H	C	D	F	C	R	D	M	K	K	F	G	G	P	N	K
		603			612			621			630			639			648
ATC	CGG	CAG	AAG	TGC	CGG	CTG	CGC	CAG	TGC	CAG	CTG	CGG	GCC	CGG	GAA	TCG	TAC
I	R	Q	K	C	R	L	R	Q	C	Q	L	R	A	R	E	S	Y
I	R	Q	K	C	R	L	R	Q	C	Q	L	R	A	R	E	S	Y
		657			666			675			684			693			702
AAG	TAC	TTC	CCT	TCC	TCG	CTC	TCA	CCA	GTG	ACG	CCC	TCA	GAG	TCC	CTG	CCA	AGG
K	Y	F	P	S	S	L	S	P	V	T	P	S	E	S	L	P	R
K	Y	F	P	S	S	L	S	P	V	T	P	S	E	S	L	P	R
		711			720			729			738			747			756
CCC	CGC	CGG	CCA	CTG	CCC	ACC	CAA	CAG	CAG	CCA	CAG	CCA	TCA	CAG	AAG	TTA	GGG
P	R	R	P	L	P	T	Q	Q	Q	P	Q	P	S	Q	K	L	G
P	R	R	P	L	P	T	Q	Q	Q	P	Q	P	S	Q	K	L	G
		765			774			783			792			801			810
CGC	ATC	CGT	GAA	GAT	GAG	GGG	GCA	GTG	GCG	TCA	TCA	ACA	GTC	AAG	GAG	CCT	CCT
R	I	R	E	D	E	G	A	V	A	S	S	T	V	K	E	P	P
R	I	R	E	D	E	G	A	V	A	S	S	T	V	K	E	P	P
		819			828			837			846			855			864
GAG	GCT	ACA	GCC	ACA	CCT	GAG	CCA	CTC	TCA	GAT	GAG	GAC	CTA	CCT	CTG	GAT	CCT
E	A	T	A	T	P	E	P	L	S	D	E	D	L	P	L	D	P
E	A	T	A	T	P	E	P	L	S	D	E	D	L	P	L		
		873			882			891			900			909			918
GAC	CTG	TAT	CAG	GAC	TTC	TGT	GCA	GGG	GCC	TTT	GAT	GAC	AAT	GGC	CTG	CCC	TGG
D	L	Y	Q	D	F	C	A	G	A	F	D	D	N	G	L	P	W
		927			936			945			954			963			972
ATG	AGC	GAC	ACA	GAA	GAG	TCC	CCA	TTC	CTG	GAC	CCC	GCG	CTG	CGG	AAG	AGG	GCA
M	S	D	T	E	E	S	P	F	L	D	P	A	L	R	K	R	A
		981			990			999			1008			1017			1026
GTG	AAA	GTG	AAG	CAT	GTG	AAG	CGT	CGG	GAG	AAG	AAG	TCT	GAG	AAG	AAG	AAG	GAG
V	K	V	K	H	V	K	R	R	E	K	K	S	E	K	K	K	E
		1035			1044			1053			1062			1071			1080
GAG	CGA	TAC	AAG	CGG	CAT	CGG	CAG	AAG	CAG	AAG	CAC	AAG	GAT	AAA	TGG	AAA	CAC
E	R	Y	K	R	H	R	Q	K	Q	K	H	K	D	K	W	K	H
		1089			1098			1107			1116			1125			1134
CCA	GAG	AGG	GCT	GAT	GCC	AAG	GAC	CCT	GCG	TCA	CTG	CCC	CAG	TGC	CTG	GGG	CCC
P	E	R	A	D	A	K	D	P	A	S	L	P	Q	C	L	G	P

4/13

Fig. 2 (Fortsetzung)

1143	1152	1161	1170	1179	1188
GGC TGT GTG CGC	CCC GCC CAG	CCC AGC TCC	AAG TAT TGC	TCA GAT GAC	TGT GGC
---	---	---	---	---	---
G C V R	P A Q	P S S	K Y C	S D D	C G
1197	1206	1215	1224	1233	1242
ATG AAG CTG GCA	GCC AAC CGC	ATC TAC GAG	ATC CTC CCC	CAG CGC ATC	CAG CAG
---	---	---	---	---	---
M K L A	A N R	I Y E	I L P	Q R I	Q Q
1251	1260	1269	1278	1287	1296
TGG CAG CAG AGC	CCT TGC ATT	GCT GAA GAG	CAC GGC AAG	AAG CTG CTC	GAA CGC
---	---	---	---	---	---
W Q Q S	P C I	A E E	H G K	K L L	E R
1305	1314	1323	1332	1341	1350
ATT CGC CGA GAG	CAG CAG AGT	GCC CGC ACC	CGC CTT CAG	GAA ATG GAA	CGC CGA
---	---	---	---	---	---
I R R E	Q Q S	A R T	R L Q	E M E	R R
1359	1368	1377	1386	1395	1404
TTC CAT GAG CTT	GAG GCC ATC	ATT CTA CGT	GCC AAG CAG	CAG GCT GTG	CGC GAG
---	---	---	---	---	---
F H E L	E A I	I L R	A K Q	Q A V	R E
1413	1422	1431	1440	1449	1458
GAT GAG GAG AGC	AAC GAG GGT	GAC AGT GAT	GAC ACA GAC	CTG CAG ATC	TTC TGT
---	---	---	---	---	---
D E E S	N E G	D S D	D T D	L Q I	F C
1467	1476	1485	1494	1503	1512
GTT TCC TGT GGG	CAC CCC ATC	AAC CCA CGT	GTT GCC TTG	CGC CAC ATG	GAG CGC
---	---	---	---	---	---
V S C G	H P I	N P R	V A L	R H M	E R
1521	1530	1539	1548	1557	1566
TGC TAC GCC AAG	TAT GAG AGC	CAG ACG TCC	TTT GGG TCC	ATG TAC CCC	ACA CGC
---	---	---	---	---	---
C Y A K	Y E S	Q T S	F G S	M Y P	T R
1575	1584	1593	1602	1611	1620
ATT GAA GGG GCC	ACA CGA CTC	TTC TGT GAT	GTG TAT AAT	CCT CAG AGC	AAA ACA
---	---	---	---	---	---
I E G A	T R L	F C D	V Y N	P Q S	K T
1629	1638	1647	1656	1665	1674
TAC TGT AAG CGG	CTC CAG GTG	CTG TGC CCC	GAG CAC TCA	CGG GAC CCC	AAA GTG
---	---	---	---	---	---
Y C K R	L Q V	L C P	E H S	R D P	K V
1683	1692	1701	1710	1719	1728
CCA GCT GAC GAG	GTA TGC GGG	TGC CCC CTT	GTA CGT GAT	GTC TTT GAG	CTC ACG
---	---	---	---	---	---
P A D E	V C G	C P L	V R D	V F E	L T
1737	1746	1755	1764	1773	1782
GGT GAC TTC TGC	CGC CTG CCC	AAG CGC CAG	TGC AAT CGC	CAT TAC TGC	TGG GAG
---	---	---	---	---	---
G D F C	R L P	K R Q	C N R	H Y C	W E

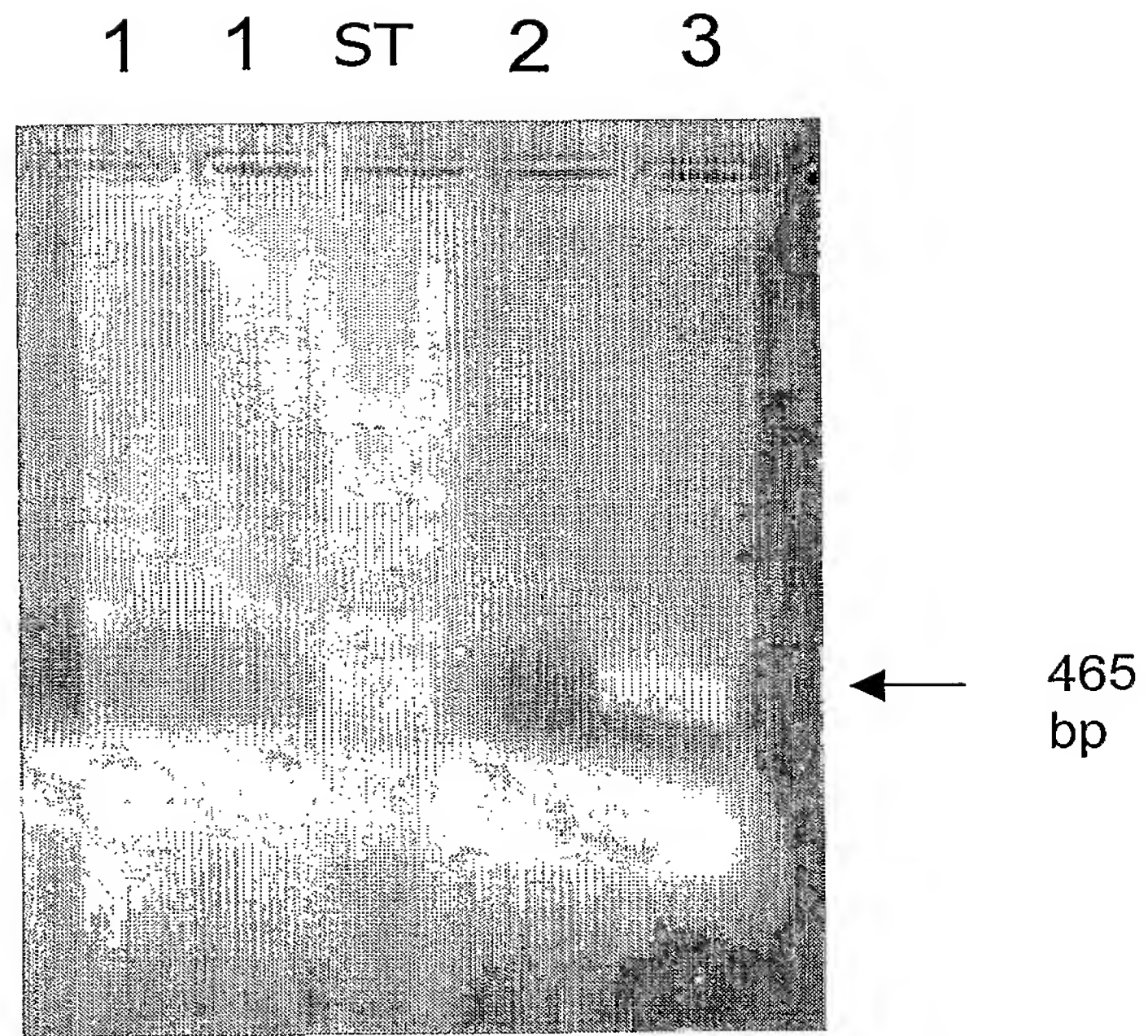
5/13

Fig. 2 (Fortsetzung)

1791	1800	1809	1818	1827	1836
AAG CTG CGG CGT GCG GAA GTG GAC TTG GAG CGC GTG CGT GTG TGG TAC AAG CTG					
-----	-----	-----	-----	-----	-----
K L R R A E V D L E R V R V W Y K L					
1845	1854	1863	1872	1881	1890
GAC GAG CTG TTT GAG CAG GAG CGC AAT GTG CGC ACA GCC ATG ACA AAC CGC GCG					
-----	-----	-----	-----	-----	-----
D E L F E Q E R N V R T A M T N R A					
1899	1908	1917	1926	1935	1944
GGA TTG CTG GCC CTG ATG CTG CAC CAG ACG ATC CAG CAC GAT CCC CTC ACT ACC					
-----	-----	-----	-----	-----	-----
G L L A L M L H Q T I Q H D P L T T					
1953	1962	1971			
GAC CTG CGC TCC AGT GCC GAC CGC TGA 3'					
-----	-----	-----			
D L R S S A D R *					

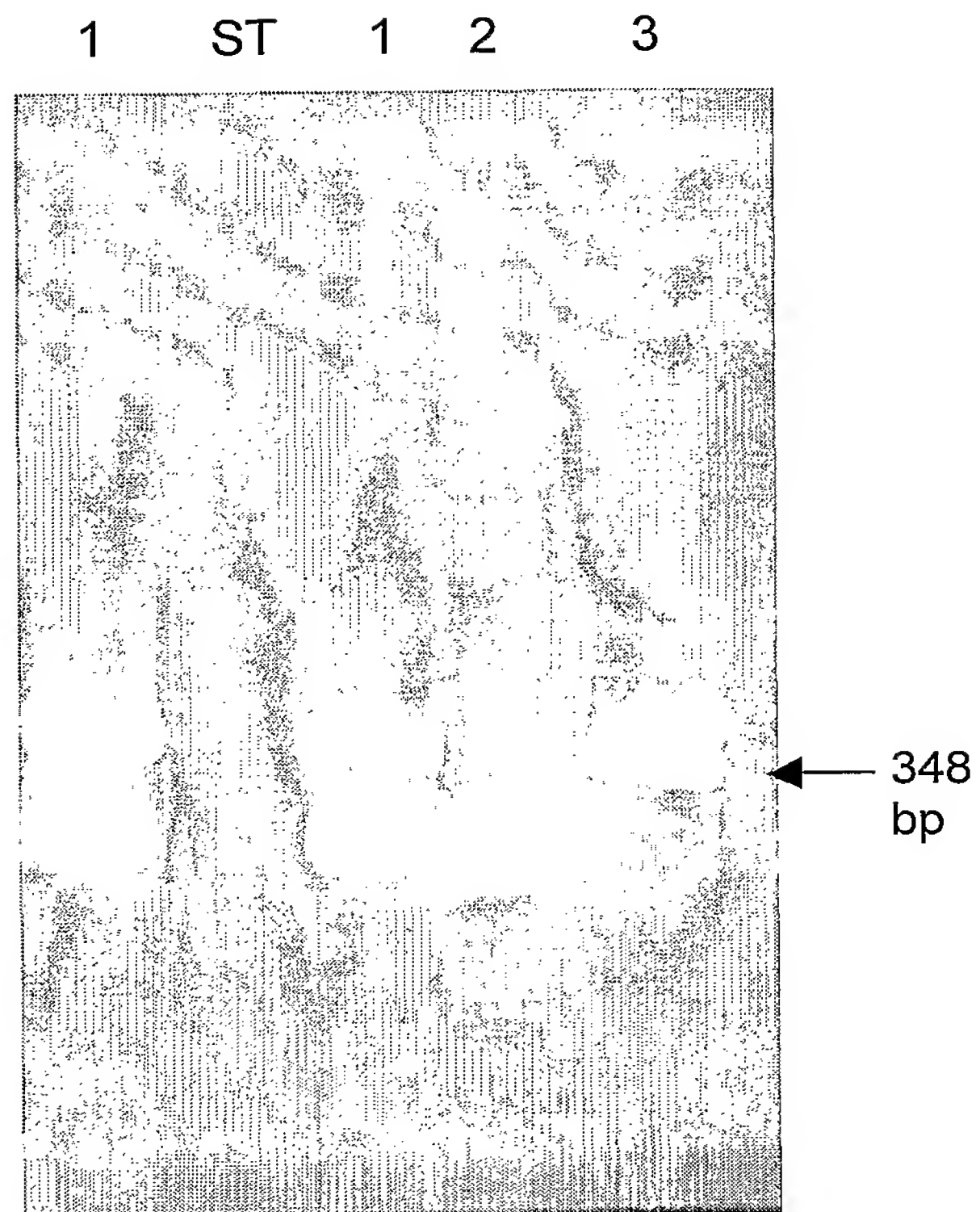
6/13

Figur 3



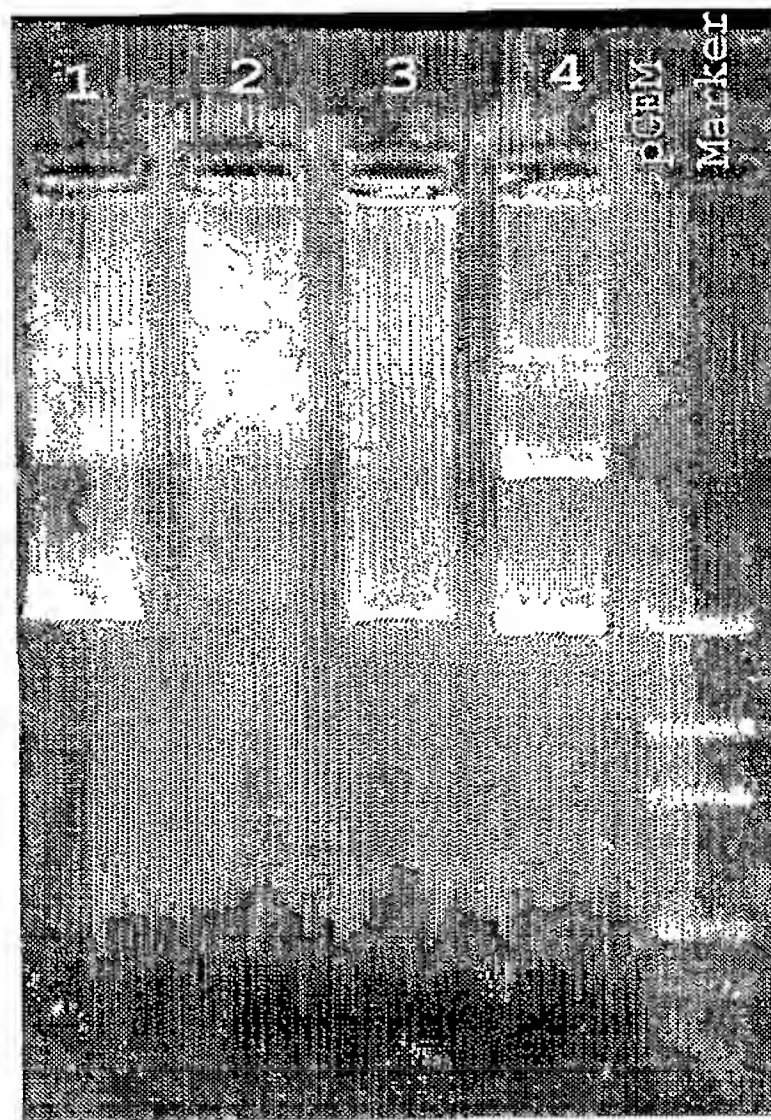
7/13

Figur 4



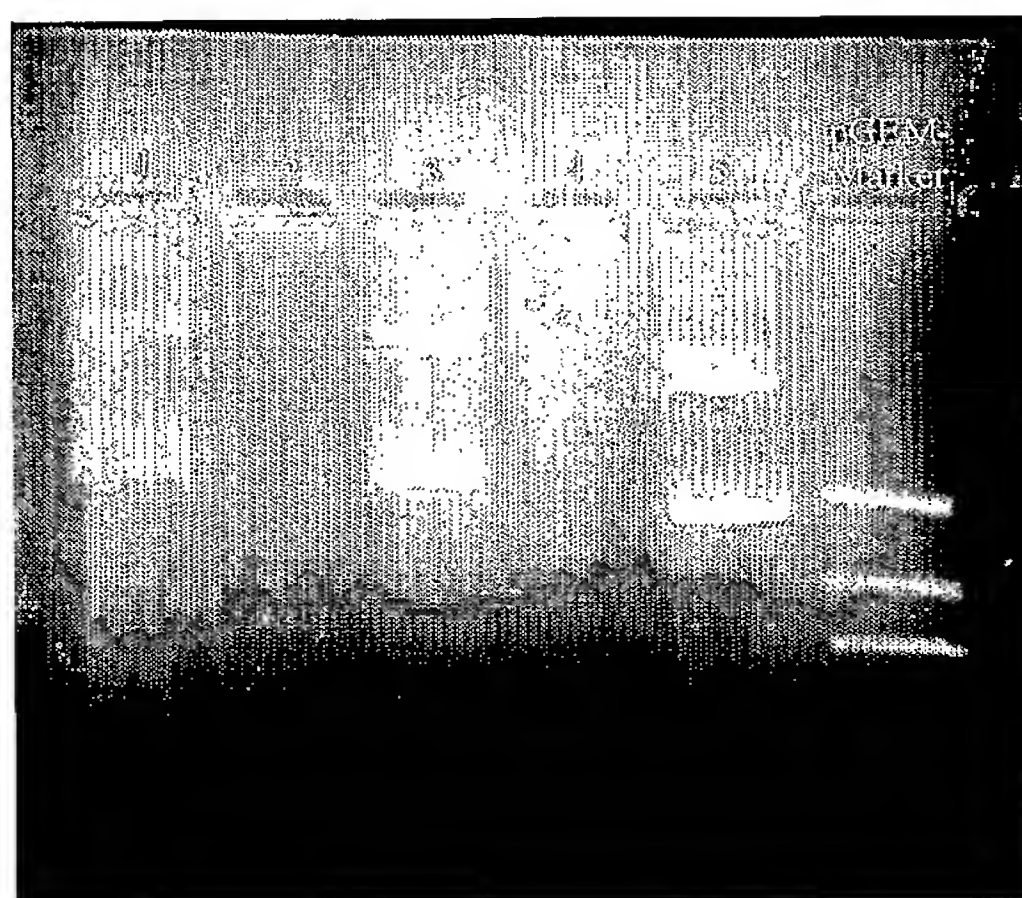
8/13

Figur 5

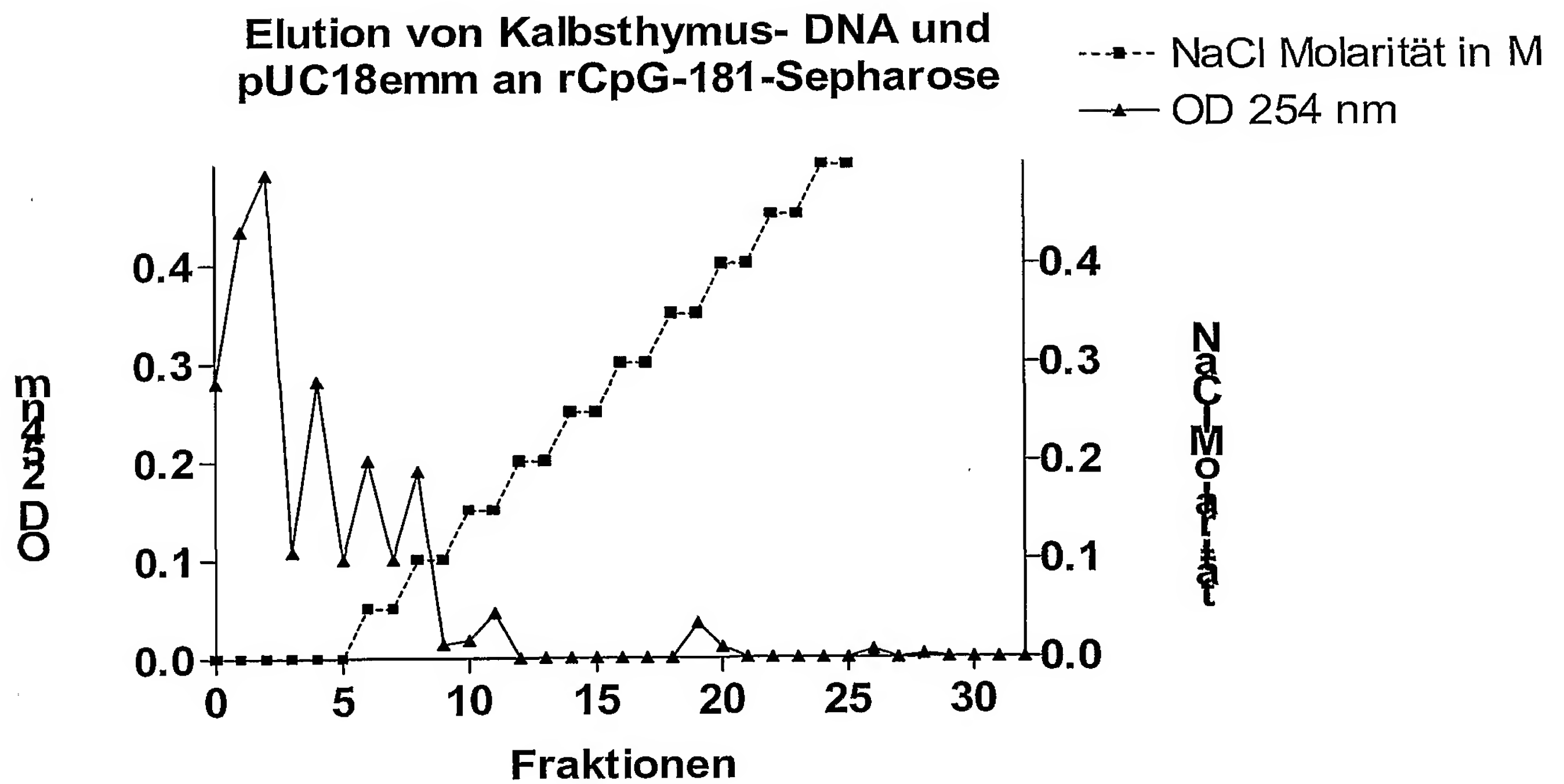


9/13

Figur 6

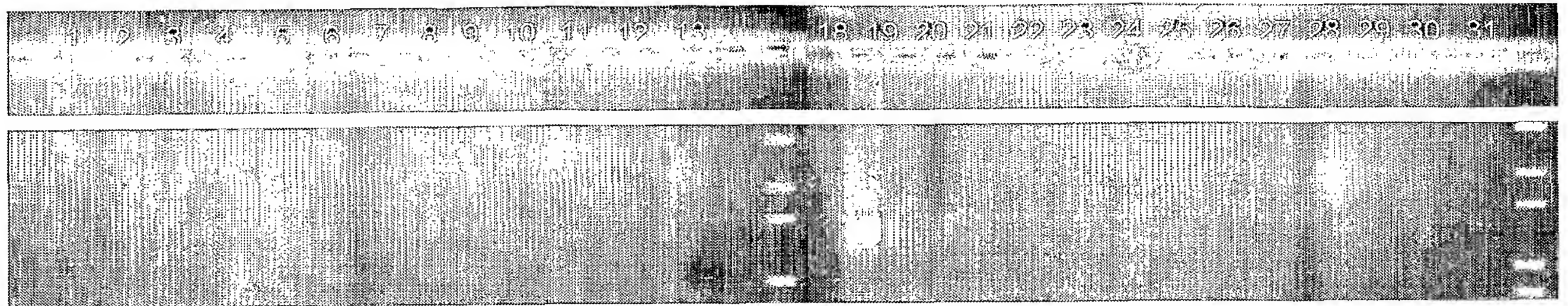


10/13

Figur 7

11/13

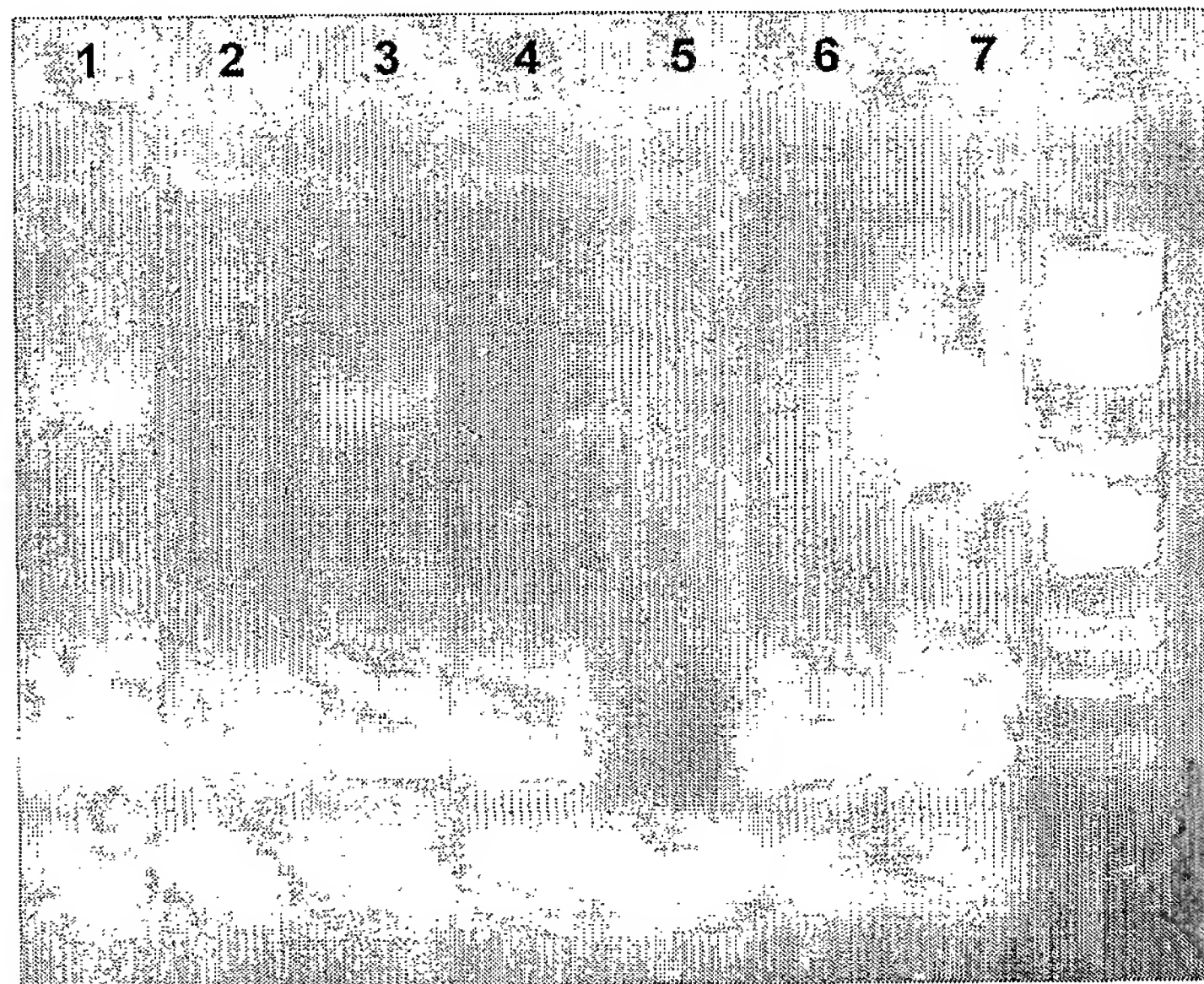
Figur 8



12/13

Figur 9

Ergebnisse der PCR nach Anreicherung prokaryotischer DNA
aus DNA- Gemisch von *Staphylococcus aureus* und human DNA
unter Verwendung von gekoppeltem CpGbP-181 Protein an CNBr- Sepharose



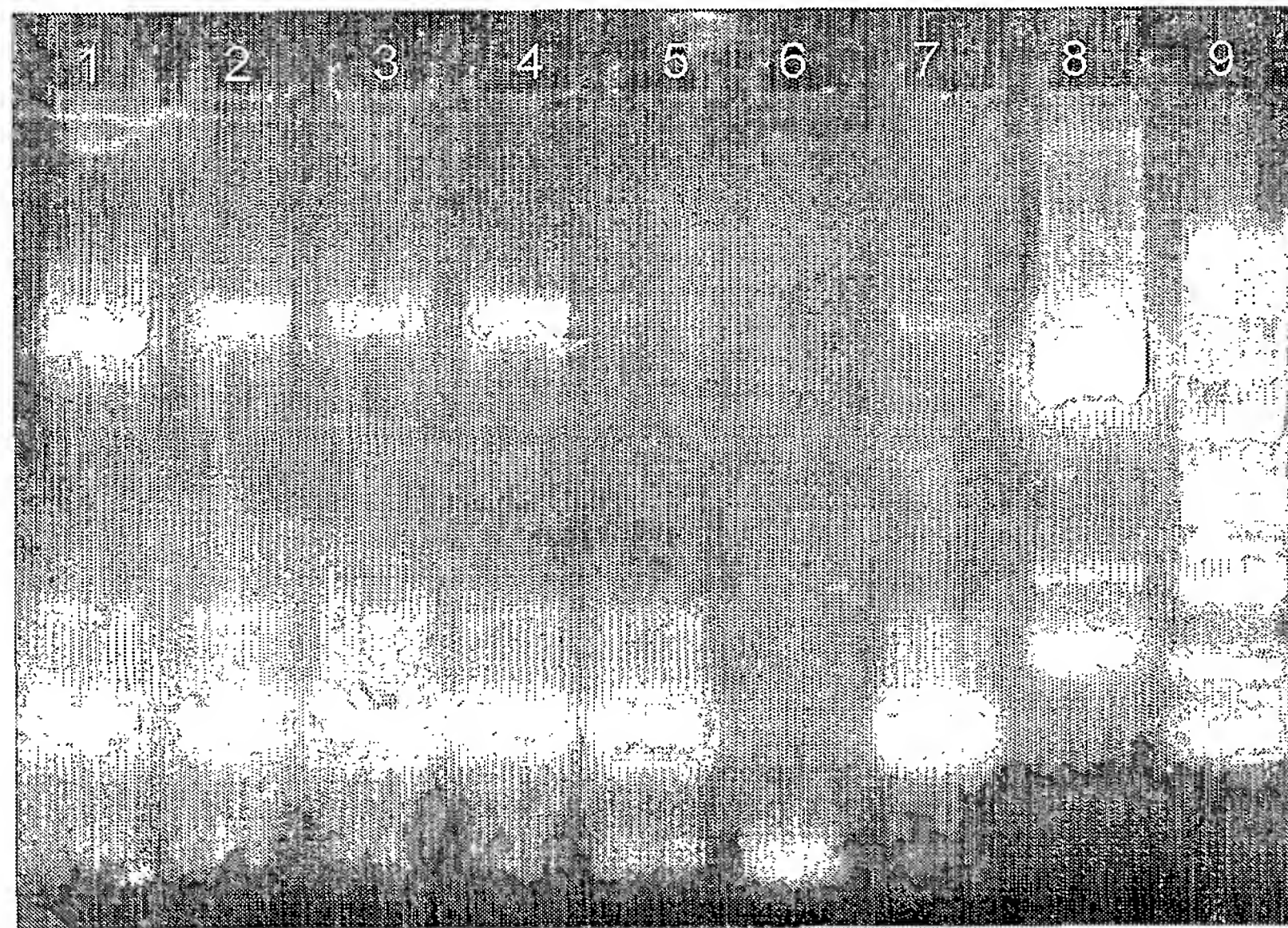
Legende:

- | | |
|--|------------------|
| 1 E ₁ (E= Elutionsfraktion) | 6 vor Säule |
| 2 E ₂ | 7 pos. Kontrolle |
| 3 E ₃ | 8 pGEM- Marker |
| 4 E ₄ | |
| 5 E ₅ | |

13/13

Figur 10

Ergebnisse der PCR nach Anreicherung prokaryotischer DNA aus DNA- Gemisch von *Staphylococcus aureus* und human DNA unter Verwendung von gekoppeltem CpG-181 Protein an AH- Sepharose



Legende:

1 E ₁ (E= Elutionsfraktion)	6 negative Kontrolle
2 E ₂	7 vor Säule
3 E ₃	8 positive Kontrolle
4 E ₄	9 BIORAD- Marker
5 E ₅	

SEQUENZPROTOKOLL

5 <110> SIRS-Lab GmbH
 <120> Verfahren zur Anreicherung/Trennung von prokaryonter DNA mittels
 eines Proteins, das nicht methylierte CpG-Motive enthaltende DNA
 spezifisch bindet
 10 <130> Pat 3696/29-PCT
 <140>
 <141>
 15 <160> 8
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 20 <211> 543
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 25 <221> CDS
 <222> (1)..(561)
 <400> 1
 30 ggt gga ggg cgc aag agg cct gtc cct gat cca aac ctg cag cgc cgg 48
 Gly Gly Gly Arg Lys Arg Pro Val Pro Asp Pro Asn Leu Gln Arg Arg
 1 5 10 15
 gca ggg tca ggg aca ggg gtt ggg gcc atg ctt gct cgg ggc tct gct 96
 Ala Gly Ser Gly Thr Gly Val Gly Ala Met Leu Ala Arg Gly Ser Ala
 35 20 25 30
 tcg ccc cac aaa tcc tct ccg cag ccc ttg gtg gcc aca ccc agc cag 144
 Ser Pro His Lys Ser Ser Pro Gln Pro Leu Val Ala Thr Pro Ser Gln
 35 40 45
 40 cat cac cag cag cag cag cag cag atc aaa cgg tca gcc cgc atg tgt 192
 His His Gln Gln Gln Gln Gln Gln Ile Lys Arg Ser Ala Arg Met Cys
 50 55 60
 45 ggt gag tgt gag gca tgt cgg cgc act gag gac tgt ggt cac tgt gat 240
 Gly Glu Cys Glu Ala Cys Arg Arg Thr Glu Asp Cys Gly His Cys Asp
 65 70 75 80
 50 ttc tgt cgg gac atg aag aag ttc ggg ggc ccc aac aag atc cgg cag 288
 Phe Cys Arg Asp Met Lys Lys Phe Gly Gly Pro Asn Lys Ile Arg Gln
 85 90 95
 aag tgc cgg ctg cgc cag tgc cag ctg cgg gcc cgg gaa tcg tac aag 336
 Lys Cys Arg Leu Arg Gln Cys Gln Leu Arg Ala Arg Glu Ser Tyr Lys
 55 100 105 110
 tac ttc cct tcc tcg ctc tca cca gtg acg ccc tca gag tcc ctg cca 384
 Tyr Phe Pro Ser Ser Leu Ser Pro Val Thr Pro Ser Glu Ser Leu Pro
 115 120 125

SEQUENZPROTOKOLL

5 <110> SIRS-Lab GmbH
 <120> Verfahren zur Anreicherung/Trennung von prokaryonter DNA mittels
 eines Proteins, das nicht methylierte CpG-Motive enthaltende DNA
 spezifisch bindet
 10 <130> Pat 3696/29-PCT
 <140>
 <141>
 15 <160> 8
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 20 <210> 1
 <211> 543
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 25 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(561)
 <400> 1
 30 ggt gga ggg cgc aag agg cct gtc cct gat cca aac ctg cag cgc cgg 48
 Gly Gly Gly Arg Lys Arg Pro Val Pro Asp Pro Asn Leu Gln Arg Arg
 1 5 10 15
 gca ggg tca ggg aca ggg gtt ggg gcc atg ctt gct cgg ggc tct gct 96
 Ala Gly Ser Gly Thr Gly Val Gly Ala Met Leu Ala Arg Gly Ser Ala
 35 20 25 30
 tcg ccc cac aaa tcc tct ccg cag ccc ttg gtg gcc aca ccc agc cag 144
 Ser Pro His Lys Ser Ser Pro Gln Pro Leu Val Ala Thr Pro Ser Gln
 35 40 45
 40 cat cac cag cag cag cag cag cag atc aaa cgg tca gcc cgc atg tgt 192
 His His Gln Gln Gln Gln Gln Gln Ile Lys Arg Ser Ala Arg Met Cys
 50 55 60
 45 ggt gag tgt gag gca tgt cgg cgc act gag gac tgt ggt cac tgt gat 240
 Gly Glu Cys Glu Ala Cys Arg Arg Thr Glu Asp Cys Gly His Cys Asp
 65 70 75 80
 50 ttc tgt cgg gac atg aag aag ttc ggg ggc ccc aac aag atc cgg cag 288
 Phe Cys Arg Asp Met Lys Lys Phe Gly Gly Pro Asn Lys Ile Arg Gln
 85 90 95
 aag tgc cgg ctg cgc cag tgc cag ctg cgg gcc cgg gaa tcg tac aag 336
 Lys Cys Arg Leu Arg Gln Cys Gln Leu Arg Ala Arg Glu Ser Tyr Lys
 55 100 105 110
 tac ttc cct tcc tcg ctc tca cca gtg acg ccc tca gag tcc ctg cca 384
 Tyr Phe Pro Ser Ser Leu Ser Pro Val Thr Pro Ser Glu Ser Leu Pro
 115 120 125

	agg	ccc	cgc	cgg	cca	ctg	ccc	acc	caa	cag	cag	cca	cag	cca	tca	cag	432
	Arg	Pro	Arg	Arg	Pro	Leu	Pro	Thr	Gln	Gln	Gln	Pro	Gln	Pro	Ser	Gln	
		130					135					140					
5																	
	aag	tta	ggg	cgc	atc	cgt	gaa	gat	gag	ggg	gca	gtg	gcg	tca	tca	aca	480
	Lys	Leu	Gly	Arg	Ile	Arg	Glu	Asp	Glu	Gly	Ala	Val	Ala	Ser	Ser	Thr	
	145					150					155					160	
10																	
	gtc	aag	gag	cct	cct	gag	gct	aca	gcc	aca	cct	gag	cca	ctc	tca	gat	528
	Val	Lys	Glu	Pro	Pro	Glu	Ala	Thr	Ala	Thr	Pro	Glu	Pro	Leu	Ser	Asp	
					165					170					175		
15																	543
	gag	gac	cta	cct	ctg												
	Glu	Asp	Leu	Pro	Leu												
				180													
20	<210>	2															
	<211>	181															
	<212>	PRT															
	<213>	Homo sapiens															
25	<400>	2															
	Gly	Gly	Gly	Arg	Lys	Arg	Pro	Val	Pro	Asp	Pro	Asn	Leu	Gln	Arg	Arg	
	1				5					10					15		
	Ala	Gly	Ser	Gly	Thr	Gly	Val	Gly	Ala	Met	Leu	Ala	Arg	Gly	Ser	Ala	
				20					25					30			
30																	
	Ser	Pro	His	Lys	Ser	Ser	Pro	Gln	Pro	Leu	Val	Ala	Thr	Pro	Ser	Gln	
			35					40					45				
35	His	His	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Ile	Lys	Arg	Ser	Ala	Arg	Met	Cys	
		50					55					60					
	Gly	Glu	Cys	Glu	Ala	Cys	Arg	Arg	Thr	Glu	Asp	Cys	Gly	His	Cys	Asp	
	65					70					75					80	
40	Phe	Cys	Arg	Asp	Met	Lys	Lys	Phe	Gly	Gly	Pro	Asn	Lys	Ile	Arg	Gln	
					85					90					95		
	Lys	Cys	Arg	Leu	Arg	Gln	Cys	Gln	Leu	Arg	Ala	Arg	Glu	Ser	Tyr	Lys	
				100					105					110			
45																	
	Tyr	Phe	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Pro	Val								

180

5 <210> 3
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

10 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

 <400> 3
 ggatccggtg gagggcgcaa gaggcctg 28

15

 <210> 4
 <211> 27
 <212> DNA

20 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

25 <400> 4
 aagcttagag gtaggtcctc atctgag 27

30

 <210> 5
 <211> 26
 <212> DNA

35 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

 <400> 5
 agcatacaag caaatTTTTT acaccg 26

40

 <210> 6
 <211> 24
 <212> DNA

45 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

50 <400> 6
 gttctgttat tgacacccgc aatt 24

55

 <210> 7
 <211> 24
 <212> DNA

 <213> Künstliche Sequenz

 <220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 7

ccttcctaataat aatcctgcgg atgt

24

5

<210> 8

<211> 28

<212> DNA

10 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

15 <400> 8

ctgaaggtag cattagtctt tgataacg

28

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/002198

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>SACHSE S ET AL: "Specific enrichment of prokaryotic DNA from human samples" JOURNAL OF THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, vol. 1, no. Supplement, July 2003 (2003-07), page 1133-169, XP002332324 the whole document & XIX INTERNATIONAL ISTH CONGRESS, BIRMINGHAM, UK,, 12 July 2003 (2003-07-12), - 18 July 2003 (2003-07-18) page 1133-169, ----- -/--</p>	1-25

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 June 2005

Date of mailing of the international search report

08/07/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sommer, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/002198

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>SACHSE S ET AL: "Using a DNA-binding protein to enrich prokaryotic DNA from a mixture of both eukaryotic and prokaryotic DNA"</p> <p>56. DGHM-JAHRESTAGUNG, 26.-29.SEPTEMBER 2004, MÜNSTER, DE, 'Online! 2004, XP002332325</p> <p>Retrieved from the Internet: URL: http://www.sirs-lab.de/content/de/pdf/kompetenzen/sachse.pdf> 'retrieved on 2005-06-16! the whole document</p> <p>-----</p>	1-25
P,X	<p>EP 1 400 589 A (SIRS-LAB GMBH)</p> <p>24 March 2004 (2004-03-24)</p> <p>claims; examples</p> <p>-----</p>	1-25
Y	<p>CROSS S H ET AL: "Purification of CpG islands using a methylated DNA binding column"</p> <p>NATURE GENETICS, NEW YORK, NY, US, vol. 6, no. 3, 1 March 1994 (1994-03-01), pages 236-244, XP000578157</p> <p>ISSN: 1061-4036</p> <p>abstract</p> <p>-----</p>	1-25
Y	<p>VOO K S ET AL: "Cloning of a mammalian transcriptional activator that binds unmethylated CpG motifs and shares a CXXC domain with DNA methyltransferase, human trithorax, and methyl-CpG binding domain protein 1"</p> <p>MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, vol. 20, no. 6, March 2000 (2000-03), pages 2108-2121, XP002262527</p> <p>ISSN: 0270-7306</p> <p>Zusammenfassung; Material und Methoden; Ergebnisse; Diskussion; figure 4</p> <p>-----</p>	1-25

International Application No
PCT/EP2005/002198

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1400589	A	24-03-2004	EP 1400589 A1	24-03-2004
			AU 2003260392 A1	04-05-2004
			WO 2004033683 A1	22-04-2004

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N15/10

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	SACHSE S ET AL: "Specific enrichment of prokaryotic DNA from human samples" JOURNAL OF THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, Bd. 1, Nr. Supplement, Juli 2003 (2003-07), Seite 1133-169, XP002332324 das ganze Dokument & XIX INTERNATIONAL ISTH CONGRESS, BIRMINGHAM, UK,, 12. Juli 2003 (2003-07-12), - 18. Juli 2003 (2003-07-18) Seite 1133-169, ----- -/--	1-25



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

16. Juni 2005

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

08/07/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Sommer, B

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	<p>SACHSE S ET AL: "Using a DNA-binding protein to enrich prokaryotic DNA from a mixture of both eukaryotic and prokaryotic DNA"</p> <p>56. DGHM-JAHRESTAGUNG, 26.-29. SEPTEMBER 2004, MÜNSTER, DE, 'Online! 2004, XP002332325</p> <p>Gefunden im Internet: URL: http://www.sirs-lab.de/content/de/pdf/kompetenzen/sachse.pdf 'gefunden am 2005-06-16! das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-25
P,X	<p>EP 1 400 589 A (SIRS-LAB GMBH)</p> <p>24. März 2004 (2004-03-24)</p> <p>Ansprüche; Beispiele</p> <p>-----</p>	1-25
Y	<p>CROSS S H ET AL: "Purification of CpG islands using a methylated DNA binding column"</p> <p>NATURE GENETICS, NEW YORK, NY, US, Bd. 6, Nr. 3, 1. März 1994 (1994-03-01), Seiten 236-244, XP000578157 ISSN: 1061-4036 Zusammenfassung</p> <p>-----</p>	1-25
Y	<p>VOO K S ET AL: "Cloning of a mammalian transcriptional activator that binds unmethylated CpG motifs and shares a CXXC domain with DNA methyltransferase, human trithorax, and methyl-CpG binding domain protein 1"</p> <p>MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, Bd. 20, Nr. 6, März 2000 (2000-03), Seiten 2108-2121, XP002262527 ISSN: 0270-7306 Zusammenfassung; Material und Methoden; Ergebnisse; Diskussion; Abbildung 4</p> <p>-----</p>	1-25

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2005/002198

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 1400589 A	24-03-2004	EP 1400589 A1	24-03-2004
		AU 2003260392 A1	04-05-2004
		WO 2004033683 A1	22-04-2004
<hr/>			